



**Helena Maria Nobre Coelho**

Licenciatura em Bioquímica

**Avaliação *in vitro* de inibidores peptídicos  
da  $\beta$ -secretase 1 para o tratamento da  
Doença de Alzheimer**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

Orientador: Doutora Ana Luísa Simplício, IBET/ITQB-UNL

Co-orientador: Doutor Hélder Vila Real, IBET/ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Prof. Doutora Maria Cristina Oliveira Costa

Vogal: Doutora Ana Luísa Ferreira Simplício



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2013**





**Helena Maria Nobre Coelho**

Licenciatura em Bioquímica

**Avaliação *in vitro* de inibidores peptídicos  
da  $\beta$ -secretase 1 para o tratamento da  
Doença de Alzheimer**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Doutora Ana Luísa Simplício, IBET/ITQB-UNL

Co-orientador: Doutor Hélder Vila Real, IBET/ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Prof. Doutora Maria Cristina Oliveira Costa

Vogal: Doutora Ana Luísa Ferreira Simplício



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2013**



Avaliação *in vitro* de inibidores peptídicos da  $\beta$ -secretase 1 para o tratamento da Doença de Alzheimer

Copyright Helena Maria Nobre Coelho, FT-UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

De uma forma geral, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer à Doutora Ana Luísa Simplício, minha orientadora, pela oportunidade que me deu para desenvolver este trabalho essencial para a minha formação, no seu laboratório. Obrigada pela sua confiança, disponibilidade e pelo incentivo demonstrados durante este último ano.

Ao Doutor Hélder Vila Real, meu co-orientador: em primeiro lugar agradeço por teres tido a ideia deste trabalho, acredito que só assim é que realizei uma tese que me preencheu em todos os parâmetros, conhecimento científico e realização pessoal. Obrigada por todo o apoio, por não colocares em causa o meu trabalho, mesmo quando eu já tinha dúvidas, pelas palavras sempre optimistas “é desta que vai dar”, obrigada pela companhia em tantas horas em frente do HPLC. Agradeço ainda por todo o conhecimento que me transmitiste, todo o tempo despendido e preocupação incansável. Foi um orgulho para mim desenvolver este trabalho ao teu lado.

À equipa do laboratório de Química Bioinorgânica e Design de Péptidos, especialmente à Doutora Olga Iranzo por toda a ajuda para a realização deste trabalho. Aos restantes membros do laboratório obrigada pela ajuda e pelas conversas de cariz científicos e outras vezes nem por isso.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacocinética e Análise Biofarmacêutica pela ajuda e bom ambiente. Em particular á Joana Lamego, ex- aluna do laboratório, por toda a partilha de conhecimento, disponibilidade, conselhos e críticas construtivas.

A todos os membros do laboratório de Nutracêuticos e Libertação Controlada, onde parte do trabalho foi realizado, agradeço a vossa ajuda, sempre bom ambiente e grande disponibilidade, mesmo quando o trabalho era intenso conseguiram sempre arranjar um espacinho para poder trabalhar na câmara de fluxo.

Um obrigada aos amigos do ITQB, Nuno Espinha, Inês Silva, Sara Horta, Cristiana Sousa e Joana Cristóvão, pela companhia nos almoços, pelas risadas, pelos momentos de desabafo em tempos de *stress* e pelos fim de tarde... ☺ Sara um obrigado pela boa companheira de casa, por me aturares quando estava mais em baixo.

A todos os meus amigos de Castro Verde e da FCT-UNL, que mesmo estando mais longe continuaram a estar sempre perto, obrigada por todo o apoio, gargalhadas e por todas as conversas. Especialmente, à Márcia Gonçalves por toda a ajuda. ☺

Ao Nuno Espinha e à Ana Semeano, um agradecimento especial pela companhia nas longas noites de escrita, em que mesmo nos momentos de pausa a nossa conversa iria acabar sempre no assunto tese, mas mesmo assim sem vocês esta tarefa seria muito mais difícil.

Gostaria de agradecer a toda a minha família por todo o carinho e apoio durante toda a minha vida que fizeram de mim aquilo que sou hoje. Em particular, agradeço aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram e me deram força para alcançar os meus objetivos. Um muito obrigada por todo o vosso esforço económico para que eu pudesse completar a minha formação e atingir esta nova etapa da minha vida. Só espero um dia poder retribuir todo o vosso esforço e dedicação.

Por fim, mas não menos importante ao Joaquim embora não haja palavras para descrever toda a gratidão que tenho por ele e pelo que tem feito por mim, quero agradecer por todo o seu carinho, apoio incondicional, paciência, por me escutar e pela motivação.



## Resumo

O aumento da esperança média de vida nos países industrializados levou a uma alteração demográfica significativa, impulsionada pelo desequilíbrio entre a taxa de natalidade e de mortalidade. Deste modo, o envelhecimento da população resulta numa maior prevalência de doenças relacionadas com a idade avançada, como a diabetes, osteoporose, cancro e doenças neurodegenerativas.

O presente trabalho centrado em torno da doença de Alzheimer, a forma mais comum de demência irreversível, visa responder à necessidade de desenvolver novas terapias com efeito retardador da doença, uma vez que os medicamentos atualmente disponíveis atuam de uma forma apenas sintomática. Desta forma, nesta tese de mestrado são testados quatro compostos de natureza peptídica que potencialmente evitam a progressão da doença de Alzheimer. Através da inibição da enzima  $\beta$ -Secretase 1, a principal responsável pela formação do péptido neurotóxico  $\beta$ -amilóide. Estes compostos, denominados ao longo da tese como inibidores A, B, C e D, foram desenhados a partir de um inibidor descrito na literatura, OM00-3 (1), ao qual foram introduzidas alterações de modo a melhorar as suas propriedades farmacocinéticas.

Os testes realizados no presente trabalho tiveram três objectivos principais: (i) avaliar a capacidade de inibição da  $\beta$ -Secretase 1 e a selectividade em relação à  $\beta$ -Secretase 2, (ii) avaliar a resistência à metabolização na corrente sistémica e no cérebro e (iii) avaliar a capacidade de permear a barreira hematoencefálica.

Verificou-se que todos os compostos preservam a função de inibição da  $\beta$ -Secretase 1 na escala nanomolar (2 e 3 nM) e apresentam selectividade em relação à enzima  $\beta$ -Secretase 2. A sua resistência à metabolização foi melhorada em relação ao inibidor inicial com tempos de semi-vida que variam entre a uma e as quatro horas. No que respeita aos ensaios de permeabilidade utilizando o modelo celular Caco-2, os resultados são indicativos da permeabilidade dos compostos A e C, contudo não foi ainda possível prová-lo consistentemente devido à irreprodutibilidade dos ensaios.

O composto que apresentou melhor combinação de resultados foi o inibidor C, com um  $IC_{50}=2,1$  nM para a  $\beta$ -Secretase 1 e uma selectividade de 8,6x em relação à  $\beta$ -Secretase 2, sendo este o composto eleito para prossecução de ensaios *in vivo*.

**Palavras chave:** Doença de Alzheimer, enzima  $\beta$ -Secretase, barreira hematoencefálica, Caco-2



## Abstract

The increasing average life expectancy in industrialized countries has led to a significant demographic change, driven by the imbalance between the birth rate and mortality rate. Thus, the increasing aging of the population, results in a larger prevalence of diseases related to advanced age, such as diabetes, osteoporosis, cancer and neurodegenerative diseases.

The present work focuses on Alzheimer disease, the most common form of irreversible dementia, and tries to contribute to the need to develop new therapies to delay the onset of the disease, since the currently available medication only attenuates the symptoms. Hence, the present master thesis reports tests on potential drugs designed to suppress Alzheimer disease progression by inhibiting  $\beta$ -Secretase 1, the main enzyme responsible for the formation of  $\beta$ -amyloid neurotoxin. These inhibitors, denominated in the report as A, B, C, and D, were developed based on a previously reported inhibitor, OM00-3 (1), already described in literature, to which modifications were introduced in order to improve its pharmacokinetic properties.

The tests performed aimed to evaluate the testing compounds at three main endpoints: (i) the inhibition ability towards  $\beta$ -secretase 1 and selectivity towards  $\beta$ -secretase 2, (ii) its resistance to metabolism in brain and in the systemic circulation, (iii) its permeability through the blood brain barrier.

All the compounds developed carry out the desired inhibition function of  $\beta$ -secretase 1 at the nanomolar scale (2 and 3 nM) and appear to be selective to this enzyme in relation to  $\beta$ -secretase 2. Their resistance against metabolization was improved in relation to the original inhibitor (OM00-3) presenting half-lives in the range of 1 to 4 hours. Relatively to the permeability tests with the Caco-2 cellular model, the results indicate that compounds A and C cross the blood brain barrier although this conclusion has not been fully proven due to test low reproducibility.

The compound with the best overall performance was inhibitor C, with  $IC_{50}=2,1$  nM for  $\beta$ -secretase 1 and a 8,6x selectivity index towards  $\beta$ -secretase 2. This compound is therefore suggested as the best choice for future *in vitro* experiments.

**Keywords:** Alzheimer's disease,  $\beta$ -Secretase enzyme, blood brain barrier, Caco-2.



# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
Índice .....	xi
Índice de figuras .....	xv
Índice de tabelas .....	xix
Abreviaturas .....	xxi
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Doença de Alzheimer .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Mecanismos de progressão da doença de Alzheimer .....	4
<b>1.2 Desenvolvimento de fármacos inibidores da <math>\beta</math>-secretase 1 .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Barreira Hematoencefálica.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Ensaios de metabolização .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Modelo celular .....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Modelos celulares para mimetizar a barreira hematoencefálica.....	17
1.5.2 Linha celular Caco-2 .....	19
<b>2 OBJETIVOS DO TRABALHO .....</b>	<b>23</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Materiais .....</b>	<b>29</b>

<b>3.2</b>	<b>Procedimento de síntese de péptidos .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Síntese do inibidor OM00-3 .....	29
3.2.2	Síntese do MCA- Glu-Val-Asn-Leu .....	33
3.2.3	Síntese do A $\beta$ 1823' .....	33
<b>3.3</b>	<b>Purificação de péptidos.....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Purificação e análise de OM00-3 .....	34
3.3.2	Purificação e análise de MCA-Glu-Val-Asn-Leu .....	34
3.3.3	Purificação e análise de A $\beta$ 1823' .....	35
3.3.4	Avaliação da pureza dos péptidos .....	35
<b>3.4</b>	<b>Ensaio de inibição .....</b>	<b>36</b>
3.4.1	$\beta$ - Secretase 1 .....	36
3.4.2	$\beta$ - Secretase 2 .....	36
<b>3.5</b>	<b>Ensaio de metabolização .....</b>	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>Cultura de células.....</b>	<b>40</b>
<b>3.7</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade.....</b>	<b>41</b>
<b>3.8</b>	<b>Quantificação de RAGE, Western Blot.....</b>	<b>41</b>
3.8.1	Quantificação de proteína total.....	42
3.8.2	Eletroforese .....	43
<b>3.9</b>	<b>Ensaio preliminares de estabilidade na presença de células.....</b>	<b>43</b>
3.9.1	Ensaio de estabilidade dos compostos em contacto com as células Caco-2.....	44
3.9.2	Bloqueio do recetor RAGE. ....	44

3.9.3	Células cultivadas na presença de A $\beta$ 1823' .....	45
3.10	Ensaio de permeabilidade .....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1	Síntese de péptidos .....	49
4.2	Ensaio de inibição .....	56
4.2.1	Otimização de condições de ensaio de inibição .....	56
4.2.2	Ensaio de inibição e seletividade .....	59
4.3	Ensaio de Metabolização .....	63
4.4	Ensaio de citotoxicidade .....	67
4.5	Confirmação da expressão do recetor RAGE em Caco-2.....	69
4.6	Ensaio preliminares de estabilidade na presença de células.....	71
4.7	Ensaio de Permeabilidade .....	75
5	CONCLUSÃO E PROPOSTAS FUTURAS .....	79
6	BIBLIOGRAFIA .....	85





## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> – Processamento da APP pelas enzimas secretases. Adaptado de Strooper <i>et al.</i> (5). .....	5
<b>Figura 1.2</b> – Esquema do mecanismo catalítico da enzima $\beta$ -secretase 1. Adaptado de Mancini <i>et al.</i> (22) .....	7
<b>Figura 1.3</b> – Alvo endossomal de inibidores da enzima $\beta$ -secretase 1. <b>A)</b> Os inibidores que não estão permanentes na membrana (mostrado como círculos de cor púrpura) não são capazes de ter acesso a estes endossomas. <b>B)</b> Inibidores ligados à membrana (círculos púrpura) são transportados para o endossoma onde podem inibir a $\beta$ -secretase. Adaptado de Rajendran <i>et al.</i> (41). .....	11
<b>Figura 1.4</b> - Representação esquemática da Barreira Hematoencefálica (BHE) e dos restantes componentes de uma unidade neurovascular. Adaptado de Chen <i>et al.</i> (47). .....	12
<b>Figura 1.5</b> - Vias de transporte através da barreira hematoencefálica. As vias de "a" a "f" são para as moléculas do soluto, e o percurso "g" envolve monócitos, macrófagos e outras células imunitárias. Adaptado de Abbott <i>et al.</i> e Chen <i>et al.</i> (44, 47). .....	14
<b>Figura 1.6</b> – Obstáculos à veiculação de péptidos para o cérebro. Os péptidos podem ligar-se a proteínas transportadoras no sangue (1), ou a células do sangue (2). Podem ainda entrar nas células endoteliais da barreira hematoencefálica (3), uma vez na célula endotelial o péptido pode atravessar a célula (4), sofrer efluxo (5) ou ser armazenado num compartimento (6). Após atravessar a barreira hematoencefálica, o péptido pode ser absorvido pelas células não-alvo, tais como pericitos e astrócitos (7), finalmente, podem interagir com a célula/recetor alvo (8). Modificado de Kim (62). 16	
<b>Figura 1.7</b> - Modelos de cultura para ensaios de permeabilidade da barreira hematoencefálica . <b>1 e 2</b> Co-cultura de células com ou sem contacto direto, respetivamente. <b>3</b> Apenas uma cultura de células endoteliais no compartimento apical de uma placa transwell de seis poços e detalhe de um poço. Adaptado de Garcel <i>et al.</i> e Nakagawa <i>et al.</i> (68, 69). .....	18
<b>Figura 2.1</b> - Diagrama representativo do método de seleção do melhor candidato a fármaco. ....	26
<b>Figura 3.1</b> - Representação do reator de síntese manual. Imagem produzida com recurso ao programa Google SketchUp. ....	30
<b>Figura 3.2</b> - Representação esquemática do procedimento de síntese do péptido OM00-3 em fase sólida. ....	32
<b>Figura 4.1</b> – Cromatograma de purificação do inibidor OM00-3. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.1. ....	50

<b>Figura 4.2</b> - Cromatograma de HPLC do inibidor OM00-3. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.1.....	50
<b>Figura 4.3</b> - Espectro de massa do composto OM00-3. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.1.....	51
<b>Figura 4.4</b> - Cromatograma de purificação do péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.2.....	52
<b>Figura 4.5</b> - Cromatograma de HPLC do péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.2.....	52
<b>Figura 4.6</b> - Espectro de MALDI-TOF do péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.2.....	53
<b>Figura 4.7</b> – Cromatograma de purificação do composto A $\beta$ 1823'. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.3 .....	54
<b>Figura 4.8</b> - Cromatograma de HPLC do péptido A $\beta$ 1823'. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.3.....	54
<b>Figura 4.9</b> - Espectro de massa do péptido A $\beta$ 1823'. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.3. ....	55
<b>Figura 4.10</b> – Monitorização da quantidade de substrato, preparado em tampão acetato, 20mM pH 4,5, por HPLC. Cromatograma preto: solução de substrato (MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP) preparada no momento de injeção; cromatograma vermelho: solução analisada 2 horas após a preparação; cromatograma azul: solução analisado após 4 horas. ....	56
<b>Figura 4.11</b> – <b>A)</b> Curva de progressão da síntese enzimática do produto MCA- Glu-Val-Asn-Leu , [BACE1]= 5 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100. <b>B)</b> Curva de progressão enzimática até ao limite de linearidade [BACE1]= 2 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100. ....	57
<b>Figura 4.12</b> - Dependência da concentração de produto formado com a concentração de enzima BACE1 com [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100, t = 2 horas. ....	58
<b>Figura 4.13</b> – <b>A)</b> Curva de progressão enzimática, [BACE2]= 7 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-	

100. <b>B)</b> Curva de progressão enzimática até ao limite de linearidade, [BACE2]= 7 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100.....	58
<b>Figura 4.14</b> - Variação da concentração de enzima BACE2 com [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100. ....	59
<b>Figura 4.15</b> – Cinéticas de inibição. Os resultados de atividade são expressos em atividade relativa à obtida na ausência de inibidor. • [BACE1]= 0,002 U/μL, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM pH 4,5, 15% de DMSO e 1% de Triton X-100, a 37°C. ▲ [BACE2]= 0,01 U/μL, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM pH 4,5, 15% de DMSO e 1% de Triton X-100, a 37°C.Os resultados foram ajustados com recurso ao suplemento Solver do Microsoft Excel 2007. ....	60
<b>Figura 4.16</b> – Curvas cinéticas de metabolização dos inibidores em soro de humano ao longo do tempo. Os resultados são apresentados em quantidade relativa ao controlo sem metabolização. Condições descritas na secção de materiais e métodos ponto 3.5. ....	63
<b>Figura 4.17</b> – Curvas cinéticas de metabolização dos inibidores em suspensão de cérebro de murganho ao longo do tempo. Os resultados são apresentados em quantidade relativa ao controlo sem metabolização. Condições descritas na secção de materiais e métodos ponto 3.5.....	64
<b>Figura 4.18</b> – Avaliação da viabilidade celular após incubação dos inibidores durante 4 e 24 horas em diferentes concentrações de OM00-3, péptidos: A – D e Aβ1823' nas células Caco-2, a percentagem de viabilidade é calculada através do controlo de células sem adição de compostos. Avaliação da viabilidade celular por MTS. ....	67
<b>Figura 4.19</b> - Análise por Western blot da expressão do recetor RAGE em extratos totais de proteínas das células Caco-2 na passagem 34 ao longo do processo de diferenciação. <b>A)</b> Pistas <b>1</b> . Controlo positivo, 100 ng RAGE comercial; <b>2</b> . 21º dia, 177 μg de proteína total das células fornecidas por DSMZ; Nas pistas <b>3</b> a <b>8</b> foram utilizados extratos celulares de células Caco-2 fornecidas por ATCC: <b>3</b> . 21º dia, 177 μg de proteína total; <b>4</b> . 17º dia, 177 μg de proteína total; <b>5</b> . 15º dia, 85 μg de proteína total; <b>6</b> . 10º dia, 177 μg de proteína total; <b>7</b> . 7º dia, 177 μg de proteína total; <b>8</b> . 3º dia, 17 μg de proteína total; A pista 2 corresponde a células Caco-2 fornecidas por Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (Barunshweig, Alemanha) (DSMZ), que foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS inativado por temperatura, 5% de CO <sub>2</sub> a 37°C. ....	69
<b>Figura 4.20</b> – Ensaio indicativo de possível permeabilidade celular. <b>I)</b> Composto em contacto com as células Caco-2 numa concentração de 2,5μM em HBSS ao longo do tempo. <b>II</b> e <b>III)</b> Ensaio de comportamento dos inibidores A e C com uma concentração de 2,5 μM; Inibidor de proteases: no	

momento da adição dos compostos adicionou-se inibidor de proteases; anti-RAGE: Células pré-incubadas com anticorpo anti-RAGE; anti-RAGE + inibidor de proteases: célula pré-incubadas com anticorpo anti-RAGE e no momento da adição dos compostos adicionou-se inibidor de proteases; Meio suplementado com A $\beta$ 1823': Células crescidas em DMEM suplementado com 10% FBS 1% de aminoácidos não essenciais e 10  $\mu$ M de A $\beta$ 1823'. ..... 72

**Figura 4.21**– Intensidades relativas do recetor RAGE por Western Blot, calculadas utilizando software ImageLab® da BioRad **P34** – Célula na passagem 34; **P34 c/ A $\beta$ 1823'** – Células na passagem 34 cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 10  $\mu$ M de A $\beta$ 1823'; **P46** – Célula na passagem 46; **P46 c/ A $\beta$ 1823'** – Células na passagem 46 cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 10  $\mu$ M de A $\beta$ 1823'; **P35 poço1 do transwell** – Células inoculadas em transwell de policarbonato de 12 poços, amostra 1; **P35 poço2 do transwell** – Células inoculadas em transwell de policarbonato de 12 poços, amostra 2; Os valores de intensidade são relativos ao da Passagem 34, uma vez que foi nesta passagem que se obteve o resultado positivo de permeabilidade. .... 74

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Fatores que influenciam o desempenho das células Caco-2. Adaptado de Sambuy <i>et al.</i> 2005 (84). .....	21
<b>Tabela 4.1</b> - Valores de IC <sub>50</sub> obtidos para cada enzima e a respetiva razão.....	62
<b>Tabela 4.2</b> – Tempos de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) dos inibidores: OM00-3 e A – D, em soro humano e em suspensão de cérebro de murganho, a 37°C. ....	66
<b>Tabela 4.3</b> – Permeabilidade aparente (Papp) dos inibidores A e C e os controlos positivo (caféina, Papp = $1,35 \times 10^{-5}$ cm/s (104) e negativo (amarelo de Lúifer, até Papp = $0,6 \times 10^{-6}$ cm/s (105) para o poço transwell correspondente em células Caco-2 (passagem 34) em monocamada na direção apical – basolateral. * - diferença percentual entre replicados. ....	75



## Abreviaturas

**ADME** – Absorção, distribuição, metabolização e excreção

**Ala** – Alanina

**APP** – Proteína precursora do péptido  $\beta$ -amilóide

**APPs $\alpha$**  – Forma solúvel da proteína precursora do péptido  $\alpha$ -amilóide

**APPs $\beta$**  – Forma solúvel da proteína precursora do péptido  $\beta$ -amilóide

**Asn** – Asparagina

**Asp** – Ácido aspártico

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**BACE1** –  $\beta$ -secretase 1

**BACE2** –  $\beta$ -secretase 2

**BCA** – Ensaio ácido bicinconínico

**BHE** – Barreira hematoencefálica

**BSA** – Albumina de soro bovino

**C59** – Fragmento C-terminal de 59 aminoácidos

**C83** – Fragmento C-terminal de 83 aminoácidos

**C99** – Fragmento C-terminal de 99 aminoácidos

**Caco-2** – Linha celular de adenocarcinoma do cólon humano

**DA** – Doença de Alzheimer

**DCM** – Diclorometano

**DIEA** – Di-isopropiletilamina

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMF** – Dimetilformamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DSMZ** – *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*

**ECACC** – Coleção Europeia de Culturas de Células Animais

**ECV304** – Linha celular de células endoteliais da veia umbilical humana

**Eq.** – Equivalentes

**FBS** – Soro fetal de bovino

**Fmoc** – Grupo protetor Fluorenilmetiloxicarbonilo

**FPRL1**– *Formyl peptide receptor-like 1*

**Glu** – Ácido glutâmico

**HATU** – *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3- tetramethyl-uronium hexafluorophosphate

**HBSS** – *Hank's Balanced Salt Solution*

**HBUTU** – *O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate*

**hCMEC/D3** – Linha celular imortalizada de células endoteliais do cérebro humano de adulto

**HOBt** – 1-hidroxibenzotriazol

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**HRP** – Peroxidase de rábano

**HUVEC** – Cultura japonesa de células endoteliais da veia umbilical humana

**IAMC** – Cromatografia de membrana artificial imobilizada

**IC<sub>50</sub>** – Concentração inibitória de 50%

**k<sub>cat</sub>** – Constante catalítica

**K<sub>i</sub>** – Constante de inibição

**K<sub>M</sub>** – Constante de Michaelis-Menten

**Leu** – Leucina

**Lys** – Lisina

**MCA** – Metoxicumarina

**MDCK** – Linha celular de rim canino

**Met** – Metionina

**MTS** – Ensaio colorimétrico de redução do composto tetrazólio

**NMDA** – Recetores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato

**NMP** – N-metil pirrolidina

**PAMPA** – Ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela

**Papp** – Coeficiente de permeabilidade aparente



**PBS** – Tampão fosfato

**P-gp** – Glicoproteína-P

**Phe** – Fenilalanina

**RAGE** – *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*

**SEC-R** – Recetor do complexo serpina-enzima

**SNC-** – Baixa penetração cérebro”

**SNC** – Sistema nervoso central

**SNC +** – Alta penetração no cérebro

**t<sub>1/2</sub>** – Tempo de semi-vida

**TBST** – Solução salina tamponada com Tris contendo 0,1% (v / v) de Tween-20

**TEER** – Resistência elétrica transepitelial

**TFA** – Ácido trifluoroacético

**T-Flask** – Frascos de cultura

**TIS** – Triisopropilsilano

**TJ** – Junções apertadas (*tight junctions*)

**TLC** – Cromatografia de camada fina

**Tranwells** – Suportes de filtro permeáveis

**UV** – Ultravioleta

**Val** – Valina

**βA** – Péptido β-amilóide



# 1 Introdução

---



## 1.1 Doença de Alzheimer

O envelhecimento da população nos países desenvolvidos é um fenómeno emergente e encontra-se intimamente relacionado com aumento da esperança média de vida associado à diminuição da taxa de mortalidade. Esta alteração demográfica, tem resultado num número crescente de pessoas que atinge a idade onde se tornam expressivas doenças que, no século passado tinham menor prevalência, como: a diabetes, a aterosclerose, a osteoporose, o cancro e doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson e de Huntington (2, 3). Estima-se atualmente que em todo o mundo existam quase cerca de 30 milhões de pessoas a viver com a DA, no entanto prevê-se que esse número deverá quadruplicar até 2050 (4). De facto todas estas doenças têm vindo a aumentar nos últimos anos, quase numa escala exponencial daí a necessidade de se intensificar a investigação nesta área com o objetivo de aumentar a qualidade de vida e o grau de independência da população envelhecida.

O presente trabalho centra-se assim em torno da DA. Aloisius Alzheimer era um famoso neurologista alemão que ficou conhecido por ser o primeiro a distinguir a doença neurodegenerativa como uma patologia, denominada por Doença de Alzheimer. Esta doença está relacionada com a idade e é a forma mais comum de demência irreversível (5). A DA é caracterizada clinicamente por uma progressão de um défice de memória episódica a um lento declínio global da função cognitiva que deixa os pacientes numa fase terminal da doença, acamados e dependentes de cuidados até à sua morte, em média, nove anos após o diagnóstico (2, 5). Uma terapia eficaz para a DA é uma das principais necessidades por satisfazer na medicina moderna. Atualmente, o desenvolvimento de medicamentos para a DA têm sido bastante confinados ao controlo sintomatológico (6). Vários fármacos estão disponíveis no mercado com o intuito de melhorar as capacidades cognitivas do paciente, contudo não são efetivamente capazes de limitar a progressão da doença. Durante muito tempo, os fármacos disponíveis para a DA tinham como base de tratamento a inibição da acetilcolinesterase, contudo têm resultados limitados, porque só melhoraram a função cognitiva em casos de demência moderada e não permitiam parar o processo de neurodegenerescência (7, 8). Atualmente, o principal fármaco para demência moderada a grave, a memantina, baseia-se no bloqueio dos recetores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) que desempenham um papel importante na excitotoxicidade, processo de acumulação de glutamato nas células neuronais que leva à apoptose e que no caso da DA é desencadeado pelo péptido  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) (7). Contudo, este tratamento apenas possui um efeito residual e a longo prazo não evita a progressão da DA. Desta forma, continua a ser um grande desafio para a comunidade científica

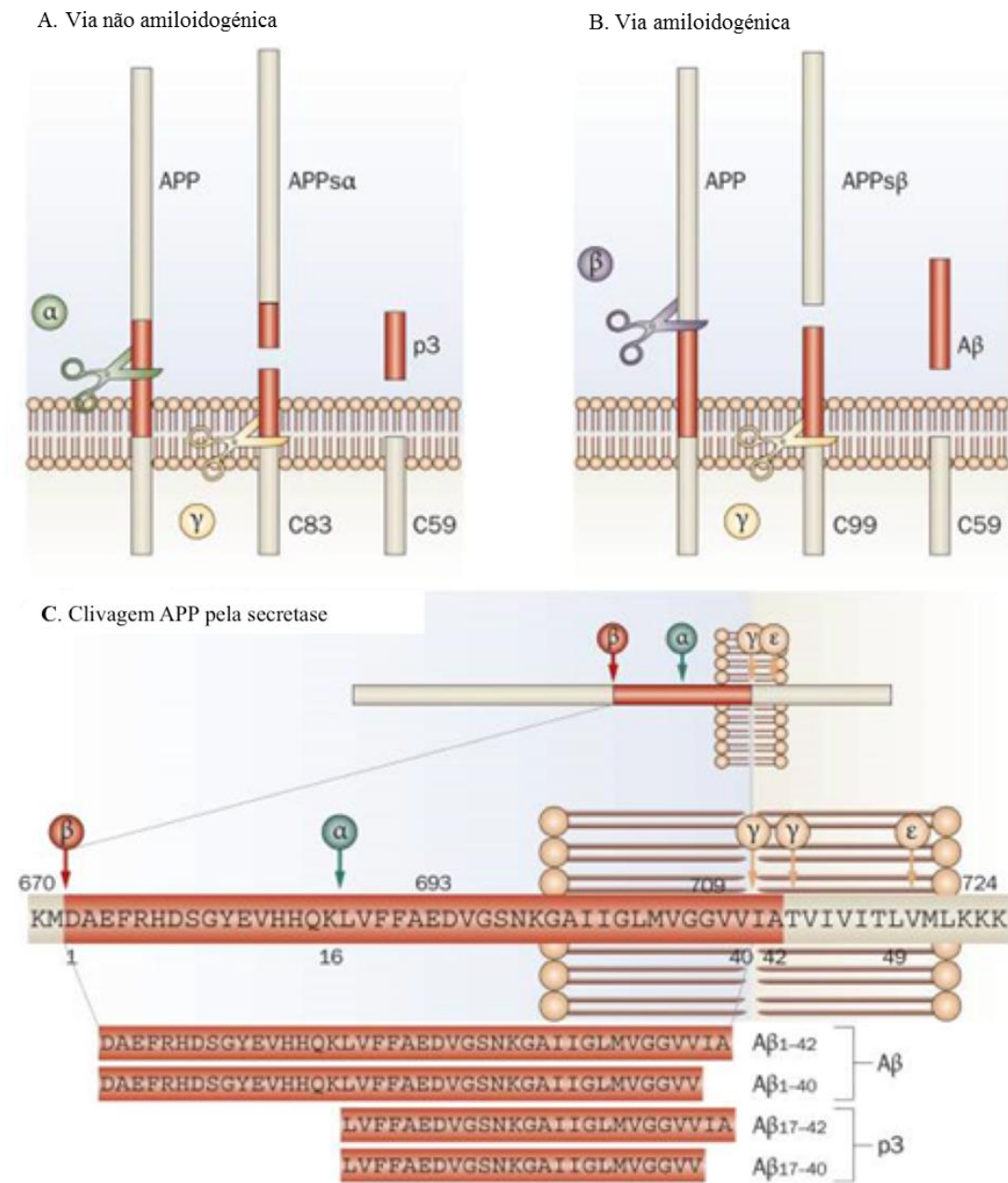
compreender os mecanismos moleculares da DA e descobrir alvos para novos fármacos, de forma a obter um tratamento adequado (8).

Existem evidências de que a DA tem causas multifatoriais, incluindo: fatores biológicos, genéticos, ambientais, comportamentais e também como um efeito secundário de uma condição de saúde (5). O envelhecimento é o principal fator biológico de risco para a DA (3). Os fatores genéticos incluem algumas mutações que já foram identificadas nos seguintes genes: proteína precursora do péptido  $\beta$ A (APP), presenilina 1 e presenilina 2 (9–11), que estão relacionadas com o aparecimento precoce da doença (12). Ambos os estudos epidemiológicos e experiências em murganhos transgênicos demonstraram que o estilo de vida, a dieta mediterrânica e uma atividade física regular podem realmente reduzir a incidência de demência e levar a alterações bioquímicas no cérebro (13). Apesar de uma intervenção adequada na mudança do estilo de vida poder contribuir positivamente para a redução da incidência da DA, os tratamentos que se baseiam na intervenção sobre os processos patológicos que estão na base da DA são os mais apontados para fornecer estratégias de tratamento eficazes (6).

### **1.1.1 Mecanismos de progressão da doença de Alzheimer**

As características patológicas mais importantes da DA são a deposição de placas senis de péptido  $\beta$ -amilóide, a acumulação de emaranhados neurofibrilares de proteínas Tau fosforiladas e a perda de neurónios e sinapses em áreas específicas do cérebro (14). As placas senis são aglomerados de pequenos péptidos, designados de péptido  $\beta$ A, este péptido é formado pela clivagem da APP através de duas secretases ligadas à membrana. A atividade destas enzimas pode assim levar à acumulação de  $\beta$ A em placas senis(6, 15).

A função da APP ainda não é completamente conhecida (16). Contudo, tem sido sugerido que tenha um papel no crescimento de sinapses, no transporte de proteínas no axónio, na transdução de sinal transmembranar, na adesão celular e no metabolismo do cálcio (14). A APP sofre proteólise por diferentes enzimas:  $\alpha$ -secretase,  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase, o que leva à formação de vários produtos resultantes da fragmentação (Figura 1.1). Estes produtos desempenham funções diversas e, por vezes adversas. Assim, a atividade celular da APP vai além da proteína em si e muitas das vezes poderá resultar de uma combinação das funções dos seus produtos de metabolização (15).



**Figura 1.1**– Processamento da APP pelas enzimas secretases. Adaptado de Strooper *et al.* (6).

#### 1.1.1.1 γ-secretase

A enzima  $\gamma$ -secretase cliva a APP em dois locais distintos, no aminoácido 40 e no aminoácido 42. Desta forma, quando associada à  $\alpha$ -secretase ou à  $\beta$ -secretase, produzem-se dois péptidos (Figura 1.1):

- no caso da  $\alpha$ -secretase, o  $A\beta_{17-40}$  de 23 aminoácidos e o  $A\beta_{17-42}$  de 25,
- no caso da  $\beta$ -secretase o  $A\beta_{1-40}$  de 40 aminoácidos e o  $A\beta_{1-42}$  com 42 aminoácidos .

A descoberta de dois genes, a presenilina-1 e presenilina-2, que estão associados a um início precoce da DA, ofereceu outra pista importante para o esclarecimento da patogenicidade da DA. As mutações nos genes das presenilinas alteram a produção do  $\beta A$  (17). Mais de 100 dessas mutações foram identificadas até ao momento, sendo que a grande maioria dos casos conduzem a uma maior propensão para a agregação do  $\beta A$  (18). Estas mutações alteraram a especificidade do sítio de clivagem da  $\gamma$ -secretase e descobriu-se ainda que a supressão de presenilina-1 reduz dramaticamente a clivagem da APP pela enzima  $\gamma$ -secretase (19).

#### 1.1.1.2 $\alpha$ -secretase

Fora do Sistema Nervoso Central (SNC), a proteína precursora do péptido  $\beta$ -amilóide é preferencialmente clivada pela enzima  $\alpha$ -secretase (Figura 1.1a). A  $\alpha$ -secretase cliva a APP dentro da sequência do  $\beta A$ , entre os aminoácidos 16 e 17, gerando um ectodomínio solúvel APPs $\alpha$  e um fragmento C-terminal ligado à membrana, APP-TF $\alpha$  (Figura 1.1a). Este último fragmento é ainda processado pela  $\gamma$ -secretase, produzindo péptidos hidrofóbicos,  $A\beta_{17-40}$  e  $A\beta_{17-42}$ , que são denominados por fragmentos p3 (Figura 1.1a,c). O processamento da APP pela  $\alpha$ -secretase é descrito como protetor no contexto da DA, pois a enzima cliva dentro da sequência do  $\beta A$ , impedindo assim a produção do péptido amiloidogénico  $\beta A$  (6, 20) .

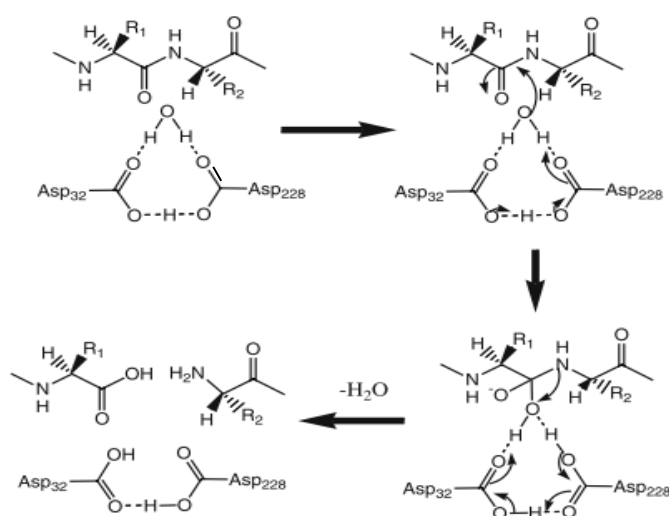
#### 1.1.1.3 $\beta$ -secretase

A  $\beta$ -secretase 1 (BACE1) é uma protease transmembranar do ácido aspártico, também designada de aspartase, que está relacionada com as famílias da pepsina e de proteases aspárticas retrovirais. A BACE1 tem uma atividade óptima a pH ácido e é localizada predominantemente em compartimentos intracelulares ácidos, como por exemplo, endossomas. Para além da descoberta da BACE1, também uma proteína homóloga,  $\beta$ -secretase 2 (BACE2), foi identificada. Ambas possuem 64% de homologia na sequência de aminoácidos o que levantou a possibilidade, acabando por se confirmar, de ambas possuírem atividade  $\beta$ -secretase



(21). Ao contrário da BACE1, que é altamente expressa em neurónios, a BACE2 é expressa em baixos níveis no cérebro e não tem a mesma especificidade de clivagem da APP comparando com a BACE1 (6, 21).

A enzima BACE1 desempenha a sua atividade enzimática através de um mecanismo ácido-base geral comum às proteases do ácido aspártico. Estas enzimas são caracterizadas por possuírem dois ácidos aspárticos (Asp) próximos um do outro, Asp32 e Asp228 no caso da  $\beta$ -secretase 1 (22). O centro ativo da BACE1 caracteriza-se por possuir zonas hidrofílicas com pequenas zonas hidrofóbicas. A regulação da atividade da BACE1 no que respeita à afinidade para o substrato e propriedades catalíticas é determinada por alterações de conformação entre a população ativa e diferentes formas inativas. A presença de duas moléculas de água no centro ativo é crucial para a função e estabilidade da enzima. O ácido aspártico protonado (Asp32) forma uma ponte de hidrogénio com o oxigénio do grupo carbonilo da ligação peptídica a clivar, e o Asp228 interage com a água. Forma-se um intermediário tetraédrico, resultando na libertação dos dois produtos peptídicos, e a enzima é restaurada para um novo ciclo de catálise (23). A representação esquemática do mecanismo catalítico da BACE1 é demonstrada na Figura 1.2.



**Figura 1.2** – Esquema do mecanismo catalítico da enzima  $\beta$ -secretase 1. Adaptado de Mancini *et al.* (23)

A enzima BACE1 é vista como o alvo terapêutico principal da DA, uma vez que tem uma atividade aproximadamente duas vezes mais elevada no cérebro de pacientes com DA, levando a uma produção excessiva de  $A\beta_{42}$  no cérebro (24, 25). Assim, a inibição da BACE1 conduz, em

teoria, à redução da produção de todas as formas do péptido  $\beta$ -amilóide, incluindo a forma patogénica  $A\beta_{42}$  (Figura 1.1b,c). Relembrando que, o mecanismo subjacente à formação das placas senis inicia-se com a clivagem sequencial da APP pela BACE1 e pela  $\gamma$ -secretase. O processamento de APP por estas duas enzimas leva a produção de dois péptidos  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$ , sendo o péptido  $A\beta_{1-42}$  o mais amiloidogénico. A agregação deste péptido leva à formação de oligómeros tóxicos que se depositam em placas amilóides. Em última análise, a formação de oligómeros é responsável pela indução dos efeitos sinaptotóxicos (26).

Estudos demonstram inequivocamente que a BACE1 é um alvo terapêutico promissor em pacientes com a DA (6). Vários grupos realizaram testes *in vivo* em murganhos, onde suprimiram o gene que codifica para a BACE1 (27, 28). Resultados iniciais indicam que murganhos BACE1  $-/-$  são viáveis e férteis, o que sugere que a inibição terapêutica da BACE1 estará livre de efeitos adversos (6, 21).

## 1.2 Desenvolvimento de fármacos inibidores da $\beta$ -secretase 1

Desde a descoberta da BACE1, que têm sido feitas numerosas tentativas para o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras, contudo poucos compostos avançaram para testes clínicos evidenciando as dificuldades na obtenção de um inibidor, seguro e potente com propriedades farmacocinéticas adequadas para atingir o sistema nervoso central (SNC) (29). A primeira geração de inibidores BACE1 foi baseada em péptidos miméticos do local de clivagem da APP, que tinham o sítio de ligação cindível substituído por um isótero (moléculas ou iões com o mesmo número de átomos e/ou o mesmo número de eletrões de valência) não hidrolisável com vista a mimetizar o estado de transição da hidrólise do ácido aspártico.(30).

O *design* de inibidores peptídicos foi baseado na comparação das sequências de aminoácidos junto da ligação cindível da APP *wild type* (-Glu-Val-Lys-Met/Asp-Ala-Glu-Phe-) (ligação cindível representada por /), que é um substrato pobre da BACE-1, e num substrato hidrolisado muito eficientemente, um mutante humano da APP encontrado na Suécia (-Glu-Val-Asn-Leu/Asp-Ala-Glu-Phe-) que tem a relação constante catalítica/ constante de Michaleis-Menten ( $k_{cat}/K_M$ ) 60 vezes mais elevada para a BACE1 do que para o tipo *wild type*. Esta sequência peptídica foi usada para gerar um inibidor típico de aspartases, substituindo a composição da ligação cindível do substrato por um isótero de hidroxietileno o que conduziu ao composto OM99-2 (Glu-Val-Asn-Leu\*Ala- Ala- Glu-Phe, em que Leu\*Ala representa o isótero de hidroxietileno) (31). O apuramento do inibidor OM99-2 levou ao desenvolvimento do inibidor OM00-3 (Glu-Leu-Asp-Leu\*Ala-Val-Glu-Phe), o inibidor mais potente conhecido até à data, com um valor de constante de inibição ( $K_i$ ) de 0,3 nM (1). O OM00-3 tem um  $K_i$  cerca de 5 vezes inferiores ao  $K_i$  do OM99-2 (32).

Apesar da potência destes inibidores (OM99-2 e OM00-3) ambos possuem duas grandes limitações para poderem chegar ao local de ação no cérebro, que consistem no facto de possuírem grandes dimensões e propriedades hidrofílicas, o que impede o seu transporte através da barreira hematoencefálica (BHE) por difusão passiva.

No sentido de tornar os inibidores mais pequenos e menos hidrofílicos desenvolveram-se inibidores não-peptídicos. Divulgações recentes das estruturas cristalográficas da BACE1(33, 34) com inibidores de menor massa molecular têm fornecido informações adicionais acerca das interações no centro ativo, que permitiram o desenvolvimento de inibidores mais potentes e seletivos, com maior permeabilidade, incluindo tanto compostos peptidomiméticos como não

peptídicos (33, 34). Por exemplo, Hussain *et al.* utilizaram uma abordagem racional de *design* de fármacos onde projetaram um inibidor não peptídico para a BACE1, GSK188909, este é uma molécula pequena, com um peso molecular de aproximadamente 600 Da, potente ( $IC_{50}=5$  nM) e seletiva, capaz de bloquear a formação de  $\beta A$  em camundongos transgênicos, quando coadministrado com um inibidor da glicoproteína-P (P-gp) (35, 36).

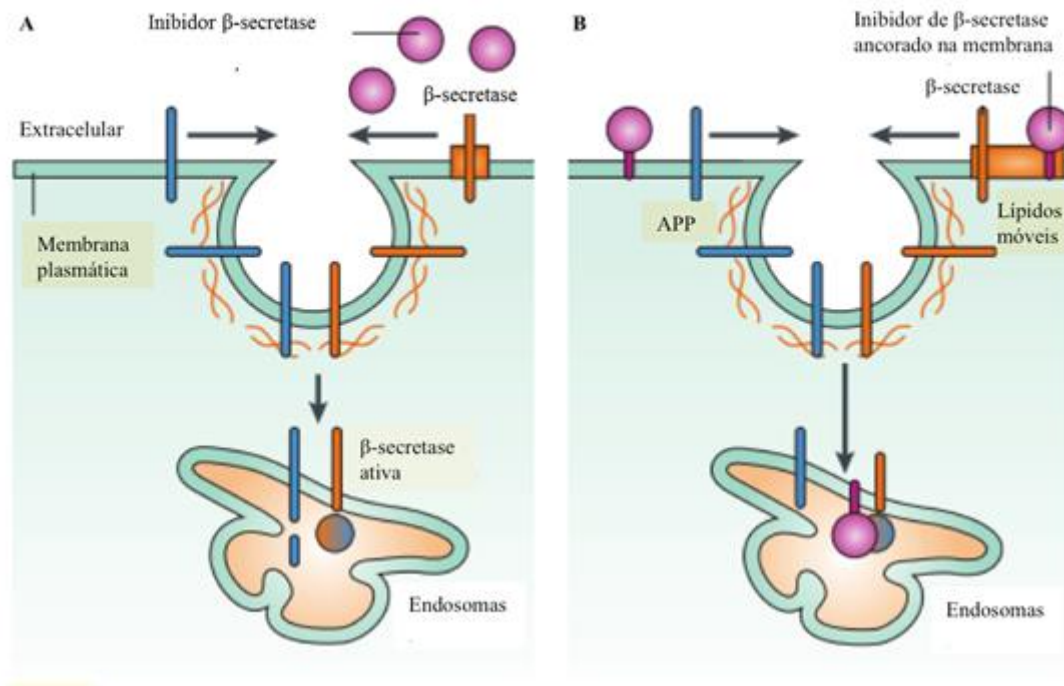
Embora os esforços iniciais no desenvolvimento de inibidores não peptídicos para a BACE1 tenham sido encorajadores, revelaram-se um desafio para a química medicinal, por diversas razões. Entre elas, o facto da BACE1 ter um local de ligação grande é a mais evidente, uma vez que torna a inibição da enzima por compostos pequenos extremamente difícil. Outra razão consiste nestes compostos sofrerem facilmente efluxo pela P-gp, o que limita a obtenção de concentrações clinicamente relevantes no Sistema Nervoso Central (29).

Idealmente, um inibidor da BACE1 deve ter um peso molecular inferior a 500 kDa, de modo a permitir a sua difusão através da BHE, ser metabolicamente estável, intrinsecamente potente e altamente seletivo para BACE1 (6). É importante que os inibidores sejam seletivos para BACE1, em relação a outras proteases aspárticas como a BACE2 e as Catepsinas D e E. Koike *et al.* demonstraram que murganhos com supressão da Catepsina D (Cat D  $-/-$ ) morriam ao fim de quatro semanas (37).

Casas *et al.* demonstraram que a inibição da BACE2 leva a uma diminuição da internalização de insulina, além de afetar a expressão do gene da insulina (38), o que por sua vez pode causar diabetes iatrogénica. Desta forma, qualquer inibidor da BACE1 usado para administração crónica, deve ser o mais seletivo possível (9, 39). Há ainda que minimizar efeitos adversos sobre a função do pâncreas e, por conseguinte, promover o controlo glicémico (38) não interferindo na ação da BACE2 uma vez que se pensa que a clivagem de APP por esta enzima não tem efeitos neurotóxicos, bem como poderá evitar a agregação do péptido  $\beta$ -amilóide (40). Contudo, para a obtenção de fármacos eficazes também estes precisam de atravessar eficientemente a BHE, sendo neste aspeto, que um grande número de potenciais neuro-fármacos falha.

Um método possível para promover a passagem através de membranas biológicas de fármacos é o seu direcionamento para compartimentos intracelulares, como os endossomas. Embora a enzima BACE1 esteja à superfície da célula, não está ativa até ser internalizada em endossomas, onde o pH endossomal é ideal para a sua atividade. A BACE1 cliva a proteína precursora de  $\beta A$  no interior do endossoma, iniciando a produção do  $\beta A$  tóxico. Como a enzima  $\beta$ -secretase apenas se encontra ativa no endossoma é então aí que os inibidores terão que ter

acesso para serem efetivos. De modo a chegarem ao interior do endossoma, é necessário que os inibidores se fixem à membrana plasmática, migrando juntamente com BACE1 para o interior da célula via endocitose (Figura 1.3) (41).

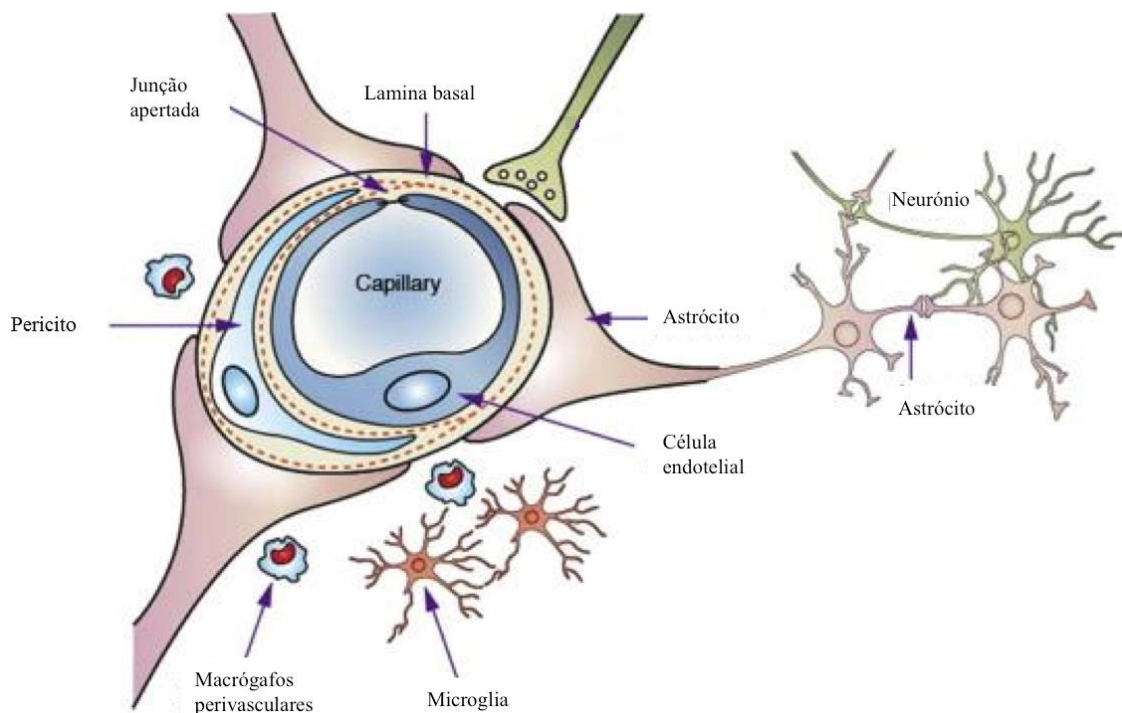


**Figura 1.3** – Alvo endossomal de inibidores da enzima  $\beta$ -secretase 1. **A)** Os inibidores que não estão permanentes na membrana (mostrado como círculos de cor púrpura) não são capazes de ter acesso a estes endossomas. **B)** Inibidores ligados à membrana (círculos púrpura) são transportados para o endossoma onde podem inibir a  $\beta$ -secretase. Adaptado de Rajendran *et al.* (41).

### 1.3 Barreira Hematoencefálica

O cérebro é protegido da entrada de xenobióticos presentes na corrente sanguínea pela BHE (42), que envolve o SNC, incluindo a medula espinal (43). A BHE é necessária para proporcionar um ambiente químico extremamente controlado e estável, ideal para a função cerebral normal.

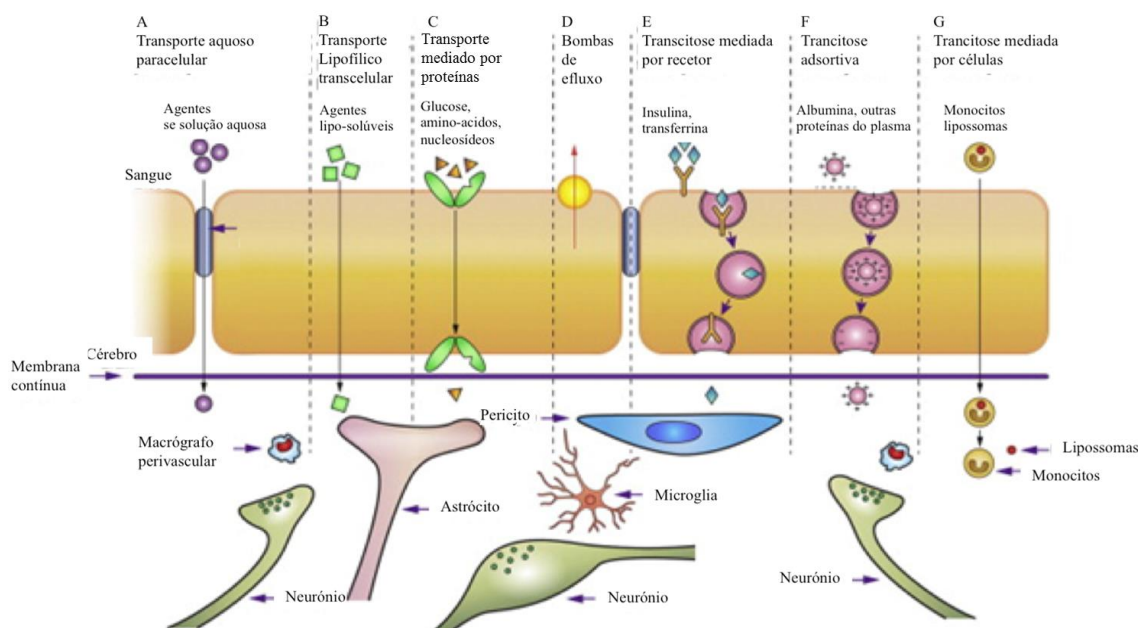
A BHE (43) é uma barreira seletiva formada principalmente por células endoteliais que revestem os vasos capilares cerebrais (44), estas células têm características bem distintas do restante endotélio vascular do organismo, apresentando junções apertadas e expressão de transportadores que tornam a permeabilidade através desta barreira muito controlada (42). A BHE possui ainda na sua constituição uma grande variedade de células que desempenham papéis coadjuvantes na indução, manutenção e função da barreira, tais como os perícitos, a micróglia, as terminações nervosas e os astrócitos que são as células que estabelecem a ligação entre os capilares sanguíneos e os neurônios (44–46) (Figura 1.4).



**Figura 1.4** - Representação esquemática da Barreira Hematoencefálica (BHE) e dos restantes componentes de uma unidade neurovascular. Adaptado de Chen *et al.* (47).

A BHE é uma barreira física e metabólica. Como barreira física são consideradas as vias de transporte (Figura 1.5). A difusão de substâncias no cérebro pode ser dividida em paracelular e transcelular, o transporte paracelular aplica-se a substâncias de pequenas dimensões solúveis em água (Figura 1.5a), pois estas têm a capacidade de se difundir através das TJ. As moléculas solúveis em lípidos penetram a barreira transcelularmente através da sua dissolução na membrana plasmática das células endoteliais (Figura 1.5b). Contudo, para quase todas as restantes moléculas, incluindo aminoácidos e glucose são necessários transportadores (Figura 1.5c), mecanismos mediados por recetores específicos (Figura 1.5e), mecanismos adsortivos, (Figura 1.5f) ou mediação celular (Figura 1.5g) para efetuar a sua permeação. A BHE possui transportadores de efluxo (como a glicoproteína-P) dependentes de energia, que limita a permeabilidade de uma grande variedade de solutos no sistema nervoso central (Figura 1.5d) (44, 45, 47). No que respeita à componente metabólica, a BHE possui uma combinação de enzimas intracelulares como monoaminaoxidasas e o citocromo P450 que pode inativar compostos neuroativos e tóxicos; e enzimas extracelulares como nucleotidasas, exopeptidasas e endopeptidasas que são capazes de metabolizar ATP e péptidos (46, 48). As células endoteliais da BHE ainda expressam proteínas de efluxo, como a glicoproteína-P e a proteína 1 e 2 de resistência a múltiplos fármacos (MRP-1 e 2) responsáveis pelo efluxo de substâncias para o lúmen do capilar sanguíneo (49).

Quanto à via de transporte por transcitose mediada por recetores, esta consiste na promoção do transporte seletivo de macromoléculas através da sua ligação a recetores. As células endoteliais cerebrais têm recetores que permitem o transporte de diversos ligandos, como fatores de crescimento, enzimas e proteínas. Esta via de transporte encontra-se intimamente ligada com a patologia de Alzheimer, uma vez que o péptido  $\beta$ -amilóide é responsável pelos efeitos neurotóxicos desta doença, atravessando a BHE por transcitose mediado pelo *receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) (50–55).



**Figura 1.5** - Vias de transporte através da barreira hematoencefálica. As vias de "a" a "f" são para as moléculas do soluto, e o percurso "g" envolve monócitos, macrófagos e outras células imunitárias. Adaptado de Abbott *et al.* e Chen *et. al.* (44, 47).

O péptido  $\beta A$  interage fisicamente com diversas proteínas de membrana, tais como o recetor do complexo serpina-enzima (SEC-R) e o recetor da insulina quando se encontra na forma monomérica, ou quando se encontra na forma fibrilar e também monomérica com os recetores RAGE e FPRL1 (*formyl peptide receptor-like 1*) (56). Contudo, a proteína responsável pela sua internalização neural é o recetor RAGE. RAGE é um membro da superfamília das imunoglobulinas, que interage com várias classes de ligandos (55). A sobre expressão neural de RAGE em murganhos com DA resulta num avanço da patologia (57), o que pressupõe que o recetor pode promover a acumulação intracelular do  $\beta A$ .

Consoante a ligação de  $\beta A$  a determinadas proteínas de membrana, as células desencadeiam diferentes respostas, uma resposta protetora, por exemplo, no caso de interação de  $\beta A$  com o recetor N-metil-D-aspartato, em que ocorre adesão do péptido, internalização e degradação, ou pelo contrário as células podem ser danificadas devido à fosforilação da proteína tau, à geração de *stress* oxidativo e estimulação de macrófagos, como é o caso da interação com o recetor RAGE (56).



## 1.4 Ensaios de metabolização

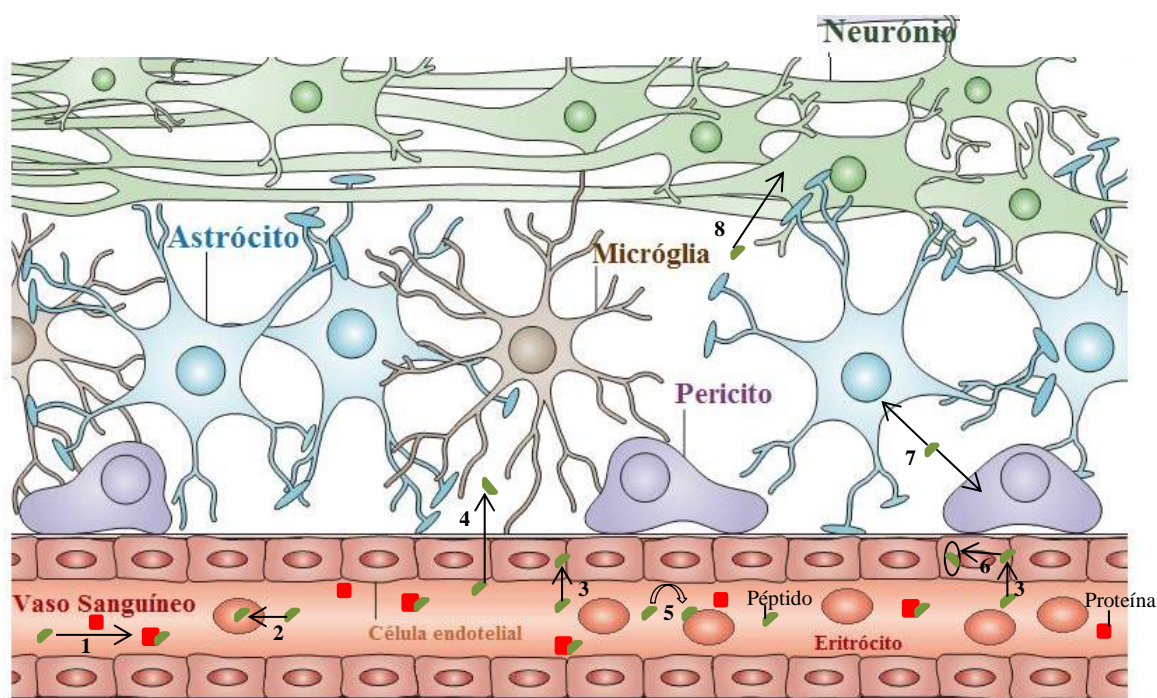
O conhecimento aprofundado dos processos de Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (ADME) é crucial no desenvolvimento de novos fármacos. Para evitar erros dispendiosos é necessária uma triagem *in vitro* dos candidatos a fármacos na fase inicial da descoberta. O conhecimento das vias metabólicas, toxicidade, estabilidade do fármaco e das enzimas específicas envolvidas no metabolismo são informações importantes no processo de desenvolvimento de fármacos e no planeamento de estudos clínicos em humanos e animais (58).

Inicialmente em ensaio metabólicos *in vitro* utilizam-se enzimas hepáticas ou preparações de tecidos. Os resultados da metabolização são obtidos através da incubação do fármaco em teste com estes sistemas, o que permite o desenvolvimento de novos compostos mais seguros e/ou mais estáveis (59). As preparações de tecidos podem ser utilizadas com diversos tipos de órgãos, como o cérebro, coração e rim, mas o fígado é o tipo de tecido mais comum para ensaios de metabolismo de fármacos (58), uma vez que é principalmente no fígado onde ocorrem os processos de conversão de xenobióticos. A utilização de preparações de tecidos tem determinadas vantagens em relação a outros sistemas, pois contêm a totalidade das enzimas metabolizadoras com todos os co-fatores presentes em concentrações relevantes, desta forma é possível ter uma informação sobre as reações de metabolismo (58).

Ultimamente tem existido um grande avanço no desenvolvimento de terapias com base em sistemas peptídicos, principalmente fármacos dirigidos para o cérebro (48, 60). No entanto, o direcionamento de fármacos de base peptídica para o sistema nervoso central continua a ser um grande obstáculo uma vez que pode ser afetado por vários fatores. Estes incluem a distribuição dentro do espaço cardiovascular, o volume total de distribuição, tempo de semi-vida, bem como a capacidade do fármaco para atingir o alvo e produzir efeitos biológicos. O compartimento cardiovascular pode ser dividido em três partes: as células do sangue, a fração de proteínas e a fração isenta de proteínas. O péptido encontra-se distribuído em equilíbrio dinâmico entre elas até à sua chegada ao cérebro (48). No caso dos péptidos o compartimento cardiovascular é um importante interveniente para a baixa biodisponibilidade dos fármacos, uma vez que estes se podem ligar a proteínas transportadoras do sangue (48, 61), devido à sua semelhança com péptidos endógenos, ou podem simplesmente entrar nos eritrócitos, o que dificulta o seu direcionamento para o cérebro (Figura 1.6) (48).

A intensidade e duração da ação de um fármaco estão dependentes do intervalo de tempo e da concentração do fármaco não ligado no local de ação. A medição direta da concentração de fármaco não ligado no local de ação, por vezes não é possível, contudo a concentração de fármaco livre no plasma pode muitas vezes ser considerada proporcional a esta uma vez que existe um equilíbrio entre composto ligado/não ligado e entre o plasma e tecidos (61).

Para além do metabolismo hepático mais relevante na administração oral, outro fator que pode afetar a chegada de péptidos ao cérebro em quantidade efetiva mesmo por administração intravenosa, é o metabolismo pelo grande número de enzimas hidrolíticas, localizadas nas células endoteliais da barreira hematoencefálica e no plasma (46). Os compostos peptídicos podem entrar nas células endoteliais da barreira hematoencefálica, atravessá-las, ou serem conduzidos para um compartimento da célula onde são armazenados ou metabolizados, ou ainda sofrer efluxo através de transportadores dependentes de energia presentes na BHE (Figura 1.6) (48).



**Figura 1.6** – Obstáculos à veiculação de péptidos para o cérebro. Os péptidos podem ligar-se a proteínas transportadoras no sangue (1), ou a células do sangue (2). Podem ainda entrar nas células endoteliais da barreira hematoencefálica (3), uma vez na célula endotelial o péptido pode atravessar a célula (4), sofrer efluxo (5) ou ser armazenado num compartimento (6). Após atravessar a barreira hematoencefálica, o péptido pode ser absorvido pelas células não-alvo, tais como pericitos e astrócitos (7), finalmente, podem interagir com a célula/recetor alvo (8). Modificado de Kim (62).

## 1.5 Modelo celular

A cultura de células animais surgiu há mais de cem anos, mas foi na década de 50 do século passado que surgiu a necessidade de vacinas virais para humanos, o que acelerou o grande desenvolvimento de bioprocessos em grande escala com células de mamífero (63).

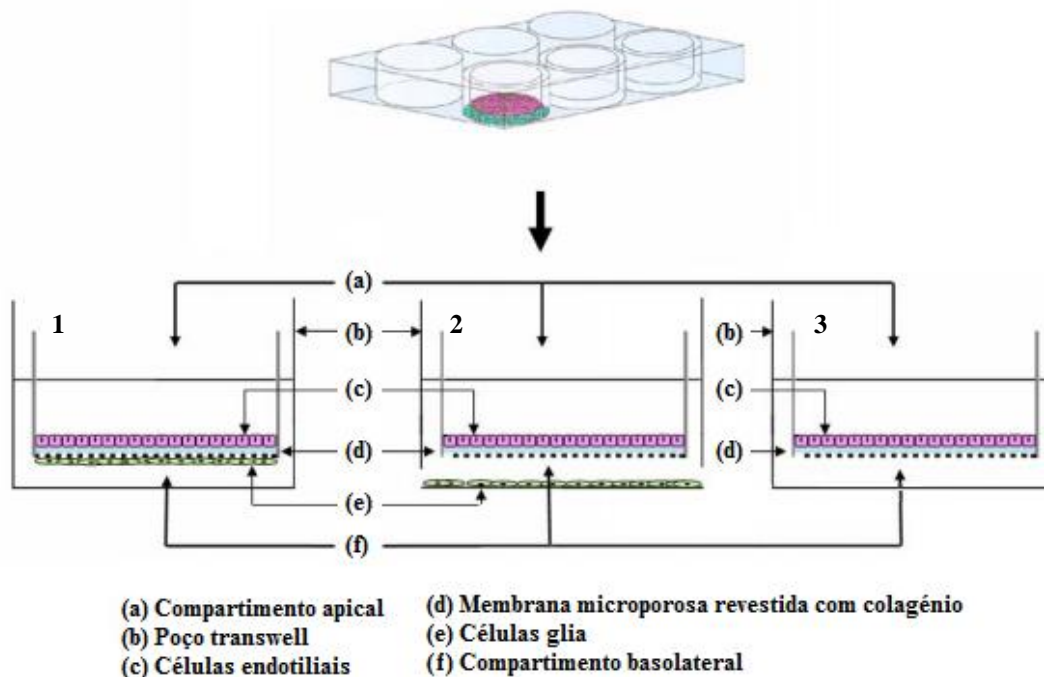
A cultura de células animais requer um nível exigente de material de laboratório e manutenção contínua, de modo a evitar alterações morfológicas e funcionais no crescimento celular e no seu cariótipo (64). Existem repositórios de culturas de células animais, como a *American Type Culture Collection* (ATCC), a *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) na Alemanha, a *Riken Gene Bank* do Japão, ou a coleção europeia de culturas de células animais (ECACC) no Reino Unido, que permitem a aquisição de linhas celulares imortalizadas (65). A utilização de culturas celulares permite a obtenção de células com boa homogeneidade e caracterização permitindo ainda uma economia de reagentes e de tempo e evitando o sacrifício de animais (65).

Em investigação e desenvolvimento de novos fármacos são utilizadas para estudos *in vitro*, onde se incluem por exemplo os testes de toxicidade, em células normais ou tumorais (por exemplo, fibroblastos, células Caco-2) e até estaminais.

### 1.5.1 Modelos celulares para mimetizar a barreira hematoencefálica

As células endoteliais do cérebro diferem das restantes células endoteliais do organismo (42, 66). Estas diferenças consistem: na ausência de fendas intercelulares devido à presença de junções apertadas que limitam a difusão paracelular de moléculas hidrofílicas; forte atividade metabólica, devido ao elevado número de mitocôndrias; e diferenças na expressão de recetores e transportadores de membrana. Estes últimos são responsáveis pelo transporte ativo de nutrientes e outros compostos do compartimento vascular para o cérebro ou por mecanismos de efluxo, que impedem a entrada ou eliminam compostos potencialmente tóxicos do cérebro para o sangue (67). As células endoteliais cerebrais de mamífero são caracterizadas pela sua permeabilidade altamente restritiva, o que se reflete numa muito elevada resistência elétrica transendotelial (67).

O conhecimento das interações entre células presentes na BHE, promoveu o desenvolvimento de modelos *in vitro* para mimetizar esta barreira. Os modelos atuais baseiam-se em sistemas cultivo de células endoteliais ou de co-cultura de células endoteliais com astrócitos, perícitos ou células glia em sistemas de duas câmaras de cultura (Figura 1.7) (68, 69). As culturas primárias geralmente são muito difíceis de estabelecer e manter, e envolvem o uso de animais para obter a cultura sendo em grande parte dos casos vantajoso a utilização de modelos celulares baseados numa linha celular contínua (70). Em 2005, foi desenvolvida uma linha celular imortalizada de células endoteliais do cérebro humano de adulto, linha celular hCMEC/D3. Esta linha exibe uma morfologia semelhante a culturas primárias de células endoteliais cerebrais, formando monocamadas confluentes de células alongadas que se inibem por contacto. Esta linha celular mantém-se estável e com atividade fisiológica, fenótipo e propriedades bioquímicas semelhantes ao endotélio cerebral observado *in vivo* (71). No entanto, a optimização das TJ em monocamadas de hCMEC/D3 continua a ser um desafio importante, para proporcionar um modelo *in vitro* que mimetize todas as características de BHE humano, incluindo restrição de permeabilidade com exclusão molecular e de efluxo funcional bem como os sistemas de transporte de influxo (72).



**Figura 1.7** - Modelos de cultura para ensaios de permeabilidade da barreira hematoencefálica . **1 e 2** Co-cultura de células com ou sem contacto direto, respetivamente. **3** Apenas uma cultura de células endoteliais no compartimento apical de uma placa transwell de seis poços e detalhe de um poço. Adaptado de Garcel *et al.* e Nakagawa *et al.* (68, 69).

Os modelos *in vitro* da barreira hematoencefálica que utilizam células endoteliais não derivadas do cérebro são linhas como: MDCK de rim canino, Caco-2 de carcinoma do cólon humano e ECV304 (70), descrita como uma linha celular transformada de forma espontânea derivada de uma cultura japonesa de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (73). Apesar da barreira intestinal e a barreira hematoencefálica serem fundamentalmente diferentes no que respeita, por exemplo, a lípidos de membrana, enzimas e transportadores, o modelo Caco-2 é capaz de dar previsões de transporte através da BHE (74), sobretudo quando o transporte é mediado por um transportador comum às duas barreiras.

Existem ainda modelos *in vitro* não baseados em células tais como o ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela (PAMPA), a cromatografia de membrana artificial imobilizada (IAMC) e eletroforese capilar. Contudo, estes modelos apenas servem para fornecer informação sobre o transporte passivo. Yoon *et al.* fez um estudo com um conjunto de 23 medicamentos não relacionados estruturalmente, que sugere que a cromatografia de membrana artificial imobilizada possa ser útil para classificar os fármacos como “alta penetração no cérebro” (SNC +) e “baixa penetração no cérebro” (SNC-) (75). Di *et al.*, desenvolveu um modelo de PAMPA modificado para a previsão de permeabilidade através da BHE (76) utilizando lípidos polares cerebrais de suíno. O estudo avalia um conjunto de 30 fármacos comerciais estruturalmente diferentes. Esta modificação nas membranas previu com sucesso o fenómeno de difusão passiva (76, 77).

### **1.5.2 Linha celular Caco-2**

Os modelos celulares estão a conquistar uma enorme popularidade entre a comunidade científica sendo amplamente utilizados na indústria farmacêutica e cosmética, em detrimento de modelos *in vivo*, uma vez que existem *guidelines* e regulamentos neste sentido (78). Por exemplo, o intestino tem uma camada de células epiteliais que constituem uma barreira limitante à absorção de fármacos e a mimetização desta monocamada de células humanas diferenciadas *in vitro* permite a previsão da sua absorção quando administrados por via oral.

A linha Caco-2, é uma linha celular derivada de um adenocarcinoma do cólon humano e em condições padrão de cultura expressa espontaneamente várias características morfológicas e funcionais de enterócitos do intestino delgado (79). As células Caco-2 permanecem indiferenciadas até atingirem confluência, ou seja, quando o crescimento celular preenche

totalmente o espaço no qual está confinado. Imediatamente depois de atingir o estado de confluência, as células iniciam o processo de diferenciação que termina entre o décimo quarto e o vigésimo primeiro dia. De acordo com o grau morfológico e funcional da diferenciação que as células Caco-2 sofrem durante os 21 dias de cultura, podemos dividir a população celular em três subgrupos: 1) no período inicial encontra-se uma cultura celular homogénea de células indiferenciadas (população sub-confluente); 2) numa fase intermédia surge uma população heterogénea de células polarizadas e diferenciadas, 3) a partir do 15º dia as células ficam homogeneamente polarizadas e diferenciadas (80). Quando diferenciadas as células Caco-2 formam junções apertadas entre as células, estruturas de microvilosidades na superfície apical das células e são expressos uma variedade de enzimas digestivas, transportadores e recetores (78, 81). Devido a estas características, a linha celular Caco-2 é um dos modelos mais utilizados para estudar o metabolismo, biodisponibilidade e permeabilidade de fármacos e outros xenobióticos (82).

A população de células Caco-2 mantida em cultura é caracterizada por grande variabilidade intrecloal, revelada pela presença de subpopulações com diferentes morfologias e características fisiológicas (83). Tem-se demonstrado que a variabilidade celular está dependente das condições de cultura, tais como a composição do meio, sistema de cultura e o número de passagem utilizado. Este facto, não só pode afetar a diferenciação e as propriedades de transporte das células Caco-2 (Tabela 1.1) (84), como levou ao estabelecimento de diferentes clones de Caco-2 mantidos em diferentes laboratórios. A adicionar a este facto está também a variabilidade de protocolos de cultura utilizados o que torna muitas vezes difícil a comparação de resultados obtidos entre laboratórios diferentes.

Para melhor reproduzir as condições existentes no intestino, as células Caco-2 são geralmente cultivadas em suportes de filtro permeáveis (*tranwells*) que permitem o acesso livre de iões e nutrientes para os dois lados da monocamada de células.

**Tabela 1.1** – Fatores que influenciam o desempenho das células Caco-2. Adaptado de Sambuy *et al.* 2005 (84).

<b>Número de passagem</b>	Atividade de enzimas nas microvilosidades	
	Morfologia	
	TEER	
	Taxa de proliferação	
	Densidade da célula	
	Expressão de transporte de glucose	
<b>Meio</b>	PH	Motilidade
		Proliferação
		Diferenciação
		Permeabilidade
	Composição	Permeabilidade
		Diferenciação
<b>Suporte</b>	Material	Absorção não específica
		Densidade da célula
		Morfologia
		TEER
		Transporte
		Formação em cúpula
	Tamanho de poro	Crescimento
		Transporte
		Ligação
	Matriz	Dispersão
		Densidade
		Diferenciação

Os recetores de membrana que desempenham atividade de transporte localizados quer na membrana apical ou basolateral, também são expressos em células Caco-2. Um dos recetores expresso por esta linha celular, Caco-2, é o recetor RAGE que inicialmente foi identificado devido à sua capacidade de se ligar a produtos finais de glicolização avançada (50, 85). Contudo, recentemente vários estudos demonstram que este recetor está envolvido no transporte do péptido  $\beta$ -amilóide através da barreira hematoencefálica (50–55). A ligação do péptido  $\beta$ -amilóide ao RAGE permite a sua transcitose através da BHE e a circulação deste péptido no cérebro está associada a stress oxidativo o que pode promover apoptose, formação de espécies reativas de oxigénio, expressão do factor de necrose tumoral, bem como desencadear respostas inflamatórias (53). As células Caco-2 também expressam proteína a glicoproteína P (P-gp), o que permite determinar o rácio de fármaco que sofre efluxo por parte desta proteína (86).









## **2 Objetivos do Trabalho**

---

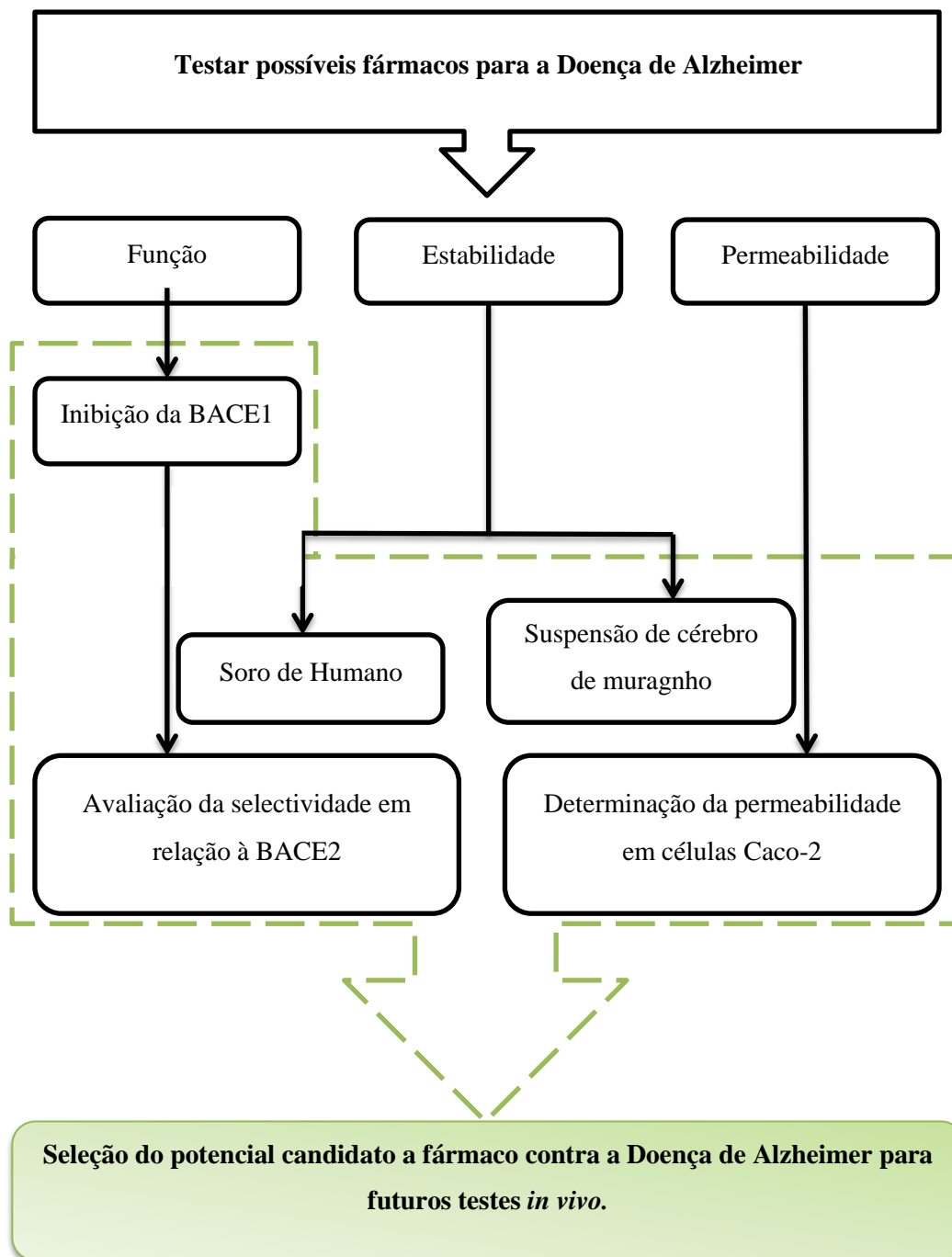


O objetivo principal do trabalho apresentado nesta tese consiste na otimização e caracterização de um conjunto de compostos sintetizados no laboratório de Farmacocinética e Análise Biofarmacêutica do iBET/ITQB da UNL, por forma a melhorar a permeabilidade de inibidores da BACE1 candidatos a fármacos para a doença de Alzheimer. Estes compostos são de natureza peptídica e são denominados ao longo da tese como inibidores A, B, C e D.

O desafio deste trabalho prende-se principalmente na dificuldade de permeação da barreira hematoencefálica. Moléculas como proteínas e péptidos por norma não atravessam esta membrana devido à sua dimensão e propriedades hidrofílicas (87). Por outro lado, moléculas hidrofóbicas são normalmente excluídas pela P-gp. Desta forma, é necessário ter em consideração as características de permeação desta barreira para desenvolver fármacos peptídicos que possam ter como alvo o sistema nervoso central.

A estratégia que levou à síntese dos inibidores A, B, C e D baseia-se numa modificação do inibidor peptídico OM00-3, o qual apesar de ser o inibidor mais potente alguma vez reportado não consegue permear a barreira hematoencefálica, não sendo por conseguinte efetivo. Essa modificação tem por base a sequência do péptido  $\beta$ -amilóide que é responsável pelo seu reconhecimento pelo recetor RAGE e consequente transporte através da barreira hematoencefálica para o cérebro. Pretende-se deste modo que os inibidores obtidos sejam simultaneamente capazes de inibir o alvo terapêutico (BACE1) bem como de atravessar a barreira hematoencefálica por transcitose por interação com o recetor RAGE, de modo a poderem assim chegar ao local de ação, o cérebro. O inibidor de referência OM00-3 foi sintetizado por mim, enquanto que os inibidores A, B, C e D são o resultado de um projeto em curso do laboratório supramencionado.

A seleção do melhor candidato a fármaco baseou-se nos seguintes critérios: capacidade dos compostos efetuarem a função pretendida, inibição seletiva da enzima  $\beta$ -secretase 1 em relação à  $\beta$ -secretase 2, resistência à metabolização e permeabilidade no modelo celular Caco-2 (Figura 2.1). Todos estes parâmetros foram analisados em comparação com um inibidor de referência (OM00-3).



**Figura 2.1** - Diagrama representativo do método de seleção do melhor candidato a fármaco.

## **3 Materiais e Métodos**

---





### 3.1 Materiais

O diclorometano (DCM), o hexano, o etanol e o cianeto de potássio (KCN) foram adquiridos à Fisher Chemical; a piperidina, o acetato de sódio, o fenol, o hidróxido de sódio, a N-metil-pirrolidina, o Triisopropilsilano (TIS), a N-metil pirolidina (NMP) e a ninhidrina à Sigma-Aldrich; o éter etílico à Scharlau; a dimetilformamida (DMF) à Lab-Scan; o ácido trifluoroacético (TFA) à Roth; di-isopropiletilamina (DIEA) à Merck.

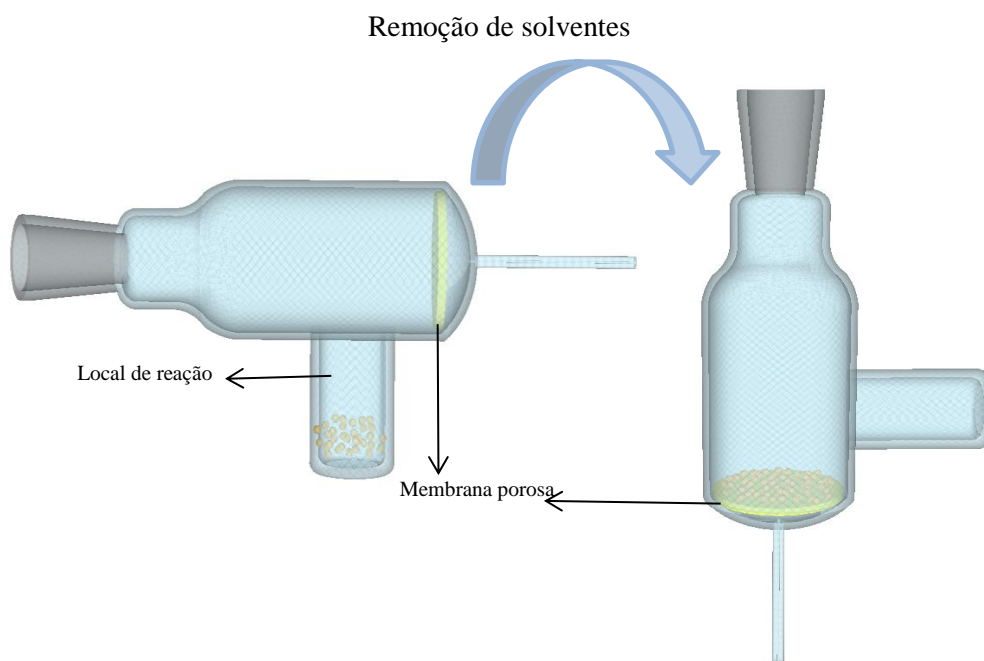
Todos os aminoácidos protegidos por Fmoc utilizados na síntese dos compostos, bem como as resinas, ativadores *O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate* (HBTU) e *O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate* (HATU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e o fluoróforo metoxicumarina (MCA) foram fornecidos pela Novabiochem.

### 3.2 Procedimento de síntese de péptidos

#### 3.2.1 Síntese do inibidor OM00-3

O péptido OM00-3 (Glu-Leu-Asp-Leu\*Ala-Val-Glu-Phe), onde Leu\*Ala representa o isótero hidroxietileno, anteriormente sintetizado no laboratório de Farmacocinética e Análise Biofarmacêutica do iBET/ITQB da UNL, foi sintetizado com base no método de síntese de péptidos em fase sólida (88). A síntese foi iniciada com 0,25 mmol de uma resina do tipo Fmoc-Phe-Wang resin (100-200 mesh), (substituição de 0,61 mmol/g). O aminoácido fenilalanina protegido por Fmoc (Fluorenilmetiloxycarbonilo) já se encontra acoplado à resina. A sequência de aminoácidos (Val-Glu-Phe) até ao isótero (Leu\*Ala) foi sintetizada num sintetizador automático de péptidos, (*CEM Liberty Automated Microwave Peptide Synthesizer*). Na síntese automática foram utilizados 4 equivalentes de cada aminoácido em relação à quantidade de resina. A restante sequência (Glu-Leu-Asp- Leu\*Ala) foi adicionada manualmente ao produto recolhido do sintetizador automático.

Na síntese manual é utilizado um reator idêntico ao representado na Figura 3.1, este reator tem uma membrana porosa que permite a filtração a vácuo dos solventes e reagentes excedentários sem que existam perdas do composto de interesse, ficando a resina retida pela membrana.



**Figura 3.1** - Representação do reator de síntese manual. Imagem produzida com recurso ao programa Google SketchUp.

Antes do acoplamento de cada aminoácido procedeu-se ao *swelling* da resina através de dois ciclos de 30 minutos em 8 mL de DCM seguidos de dois ciclos de 15 minutos em 8 mL de DMF, sob atmosfera inerte ( $N_2$ ) e entre adições removeram-se os solventes por filtração a vácuo. Após este procedimento, efetuou-se a remoção do grupo protetor (Fmoc), com 20% de piperidina em DMF, sob agitação e  $N_2$  durante 15 minutos, este processo foi realizado em duplicado de forma a garantir a remoção total do grupo protetor. Entre os processos de remoção do Fmoc, a resina foi lavada com DMF durante 5 minutos. A remoção de Fmoc foi monitorizada por cromatografia de camada fina (TLC), usando como fase móvel: éter dietílico e hexano (3:2, v/v); foi ainda realizado um teste de *Kaiser* (descrito abaixo), que evidencia a presença de aminas livres. Após a confirmação da existência do grupo amina livre, procedeu-se ao acoplamento do aminoácido seguinte.

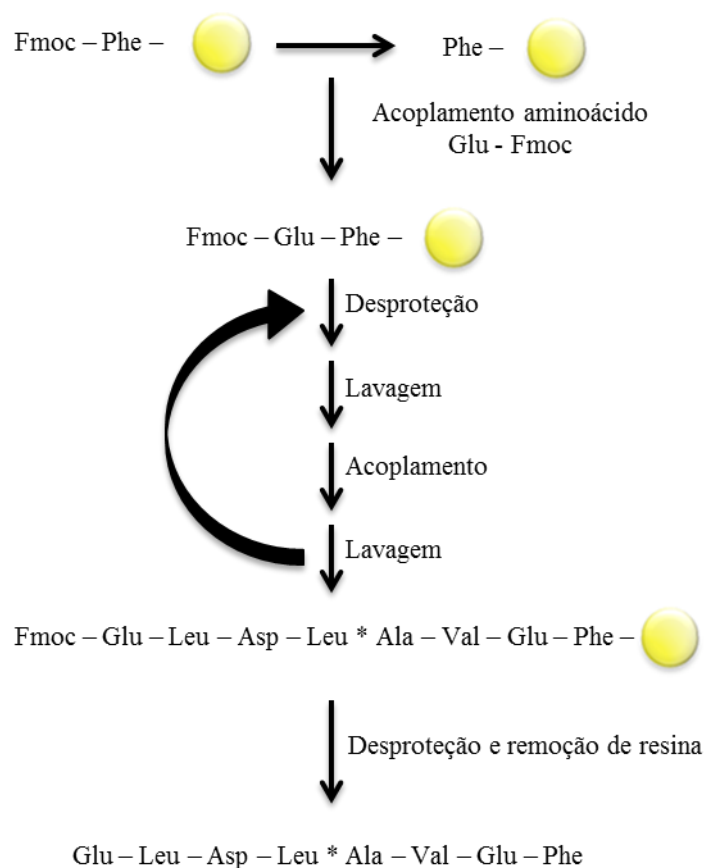
Para o acoplamento de cada aminoácido preparou-se uma mistura de acoplamento e uma solução de base para catalisar a reação. A mistura de acoplamento e a solução de base preparadas foram as seguintes:

Mistura de acoplamento – *O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate* (HBTU) (1,95 eq.), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (2 eq.) e aminoácido protegido com Fmoc (Fmoc-aminoácido) (2 eq.) em 2 mL de DMF. No caso de incorporação do isómero hidroxietileno (Leu\*Ala) apenas se adicionou 1,1eq. de Fmoc-aminoácido, em virtude de ser um aminoácido muito difícil de obter, tendo sido também essa a razão que levou à necessidade de sintetizar parte do composto pela via manual.

Solução de base – di-isopropiletilamina (DIEA) (4 eq.) em N-metil pirolidina (NMP).

Após a preparação da mistura de acoplamento, esta adicionou-se ao reator e deixou-se em agitação sob N<sub>2</sub>; decorrido 1 minuto colocou-se 1 mL da solução de base, mantendo a agitação em atmosfera inerte. Após 2 horas removeu-se o solvente e reagentes excedentários por filtração a vácuo, e lavou-se 3 vezes a resina com DMF. Procedeu-se a um teste de *Kaiser* para verificar a ausência de grupos amina livres. Este processo de adição de aminoácidos foi repetido até à conclusão da sequência peptídica Figura 3.2.

No final da sequência procedeu-se à remoção da resina, sendo que esta foi previamente lavada 3 vezes com DMF e 3 vezes com DCM. Para a remoção efetiva do péptido final e dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos utilizou-se uma solução de 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de TIS e 2,5% de água Milli-Q, durante 2 horas em agitação e sob atmosfera N<sub>2</sub>. Filtrou-se a mistura de desproteção por filtração a vácuo, o filtrado foi recolhido e concentrado por evaporação do TFA com recurso a um fluxo de N<sub>2</sub>. Adicionou-se lentamente éter dietílico frio num banho de gelo até se observar a precipitação do péptido, o precipitado foi filtrado e seco na bomba de vácuo (*Edwards*), no final analisou-se por espetrometria de massa a presença do péptido de interesse utilizando a técnica de ionização por electrospray (ESI), estes dados foram fornecidos / obtidos pelo Laboratório de Espetrometria de Massa, a Unidade de Serviços Analíticos, Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa.



**Figura 3.2** - Representação esquemática do procedimento de síntese do péptido OM00-3 em fase sólida.

### 3.2.1.1 Kaiser test

Para o ensaio colorimétrico de detecção de terminais amina livres prepararam-se 3 soluções: 5% de ninhidrina em etanol (g/L), 80% de fenol em etanol (g/L) e 2 mL de KCN 0,001M em 98 mL de piridina. Recolheram-se 10 a 20 esferas de resina do reator para um *ependorff* lavou-se com 200µL de etanol, removeu-se o etanol e adicionou-se 100µL de cada uma das soluções anteriores, agitou-se e aqueceu-se a 115°C num AccuBlock™ Digital Dry Baths (*Labnet international, Inc.*) durante 5 a 10 minutos. A presença de grupos amina livres, indicativo de desproteção completa do grupo Fmoc ou de um eventual acoplamento incompleto, é evidenciada por observação ao microscópio (*Leica M-Series Stereo MZ6*, com iluminação de *KL 1500 LCD - SCHOTT*) de uma coloração azul-escura tanto na solução como nas esferas de resina. Num acoplamento completo, não há coloração.

### 3.2.2 Síntese do MCA- Glu-Val-Asn-Leu

A síntese do produto da reação enzimática entre a BACE1 e o substrato (MCA- Glu-Val-Asn-Leu/Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP, onde / representa a ligação cindível e DNP é 2,4-dinitrofenol) foi realizada seguindo o protocolo descrito para a síntese manual do péptido OM00-3 (88), com a exceção da resina, neste péptido utilizou-se uma resina do tipo *Fmoc-Leu-Wang resin* (100-200 mesh). Também a adição do fluoróforo metoxicumarina (MCA) necessitou de um ativador mais forte e de uma reação de acoplamento com uma duração de 24 horas. O ativador usado foi o HATU (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate) (89). Este péptido foi utilizado como padrão do produto da reação enzimática.

### 3.2.3 Síntese do A $\beta$ 1823’.

O péptido A $\beta$ 1823’ (Val-Phe-Phe-Glu-Asp) é uma fração do péptido neurotóxico  $\beta$ A e foi preparado com o objetivo de induzir a expressão do recetor RAGE em células Caco-2. A síntese deste composto foi efetuada na íntegra no sintetizador automático (*CEM Liberty Automated Microwave Peptide Synthesizer*) com 4 equivalentes de Fmoc-aminoácido e 3,3 equivalentes de HOBt, HBTU e DIEA. Foi utilizada uma resina do tipo *Rink Amide - MBHA resin* (100-200 mesh), que permite obter um terminal amida ao invés de um ácido carboxílico. Quando o péptido A $\beta$ 1823’ estava completo, o terminal amina foi modificado manualmente por um terminal amida, através de uma reação de acilação com 25 eq. de anidrido acético, 12,5 eq. de DIEA em 2 mL de DMF, durante 1 hora sob agitação e azoto. Só após esta modificação é que se procedeu à remoção total do péptido da resina.

### 3.3 Purificação de péptidos

A purificação dos péptidos foi realizada num HPLC preparativo (*Waters 2535*), equipado com uma bomba quaternária, injetor manual (*Waters flexInject*), desgaseificador de solventes (*Degasys DG-4413, Uniflows*) e um detetor UV/Visível (*Waters 2489*), uma pré-coluna (RP-12, 5  $\mu$ m) e uma coluna de fase reversa (*Júpiter 4 mm Proteo 90 A; C12; 250x21,20mm; 4  $\mu$ m, Phenomenex*). Os eluentes utilizados foram o eluente A: água *Milli-Q*:TFA (100:0,1 v/v) e o eluente B: acetonitrilo:água *Mili-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v), a um fluxo de 10 mL/min. Os comprimentos de onda analisados foram, 220 nm para todos os compostos, 260 nm para os compostos contendo fenilalanina e 323 nm para compostos contendo MCA. As amostras recolhidas com o péptido puro foram liofilizadas num aparelho *FreeZone plus 2.5L (LabConco, VWR)* e posteriormente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.1 Purificação e análise de OM00-3

Para purificar péptido OM00-3, este foi dissolvido com uma concentração de 2 mg/mL numa solução de 42%  $\text{H}_2\text{O}$  *Mili-Q*, 8% de NaOH 0,2M, 8% de tampão acetato 20 mM a pH=4,5 e 42% de eluente B (acetonitrilo:água *Milli-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v)). O programa de purificação do péptido OM00-3 é um programa maioritariamente isocrático. Inicia-se com uma percentagem de 90% de eluente A e 10% de eluente B, a partir dos 2 até aos 30 minutos com 68,5% de eluente A e 31,5% de eluente B e o restante tempo até aos 50 minutos é utilizados para ciclos de lavagem a 100% de B, 100% de A e para equilibrar a coluna para a próxima injeção com 90% de eluente A e 10% de eluente B.

Para a análise por espectrometria de massa a amostra foi dissolvida em 100  $\mu$ l de solução NaOH (100 mM) e 600  $\mu$ l ACN + 300 mM solução de ácido acético 10%. Os espectros de massa da amostra e do solvente foram adquiridos em modo positivo num espectrómetro de massa *API-ION TRAP(PO03MS)*.

#### 3.3.2 Purificação e análise de MCA-Glu-Val-Asn-Leu

O péptido MCA-Glu-Val-Asn-Leu foi solubilizado em 20% de  $\text{H}_2\text{O}$ , 2% de NaOH (1M), 10% de Acetonitrilo e 68% de tampão fosfato 10 mM a pH 7. O processo de dissolução seguiu a ordem descrita de forma a minimizar a degradação do péptido, sendo essencial a presença do

tampão fosfato a pH 7, de forma a neutralizar a solução, uma vez que o composto se degrada a pH básico. Na purificação deste péptido utilizou-se um programa que inicia com uma fração 90/10 de eluente A/eluente B até aos 2 minutos, seguida de uma zona isocrática dos 2 minutos até aos 25 minutos de 71% de eluente A e 29% de eluente B. O restante tempo até aos 45 minutos é utilizado para ciclos de lavagem a 100% de B, 100% de A e para equilibrar a coluna para a próxima injeção com 90% de eluente A e 10% de eluente B.

Na sua análise por espectroscopia de massa a amostra do péptido foi aplicada diretamente numa placa de MALDI utilizando ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA, 5mg/mL) como a solução de matriz em 50% (v / v) de acetonitrilo e 5% (v / v) de ácido fórmico. O espectro de massa foi adquirido com os modos de MS reflectão positivos usando um instrumento *MS MALDI-TOF/TOF (4800plus MALDI TOF / TOF analisador) (PO 25MS)*.

### 3.3.3 Purificação e análise de A $\beta$ 1823'

Para purificar o péptido A $\beta$ 1823', este foi dissolvido com uma concentração de 2 mg/mL numa solução de 42% H<sub>2</sub>O *Mili-Q*, 8% de NaOH 0,2M, 8% de tampão acetato 20 mM a pH=4,5 e 42% de eluente B (acetonitrilo:água *Milli-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v)). Para a purificação deste péptido utilizou-se um programa que dos 0 aos 2 minutos tem uma razão eluente A/ eluente B de 80/20, aos 2 minutos inicia-se uma razão de 65 % de A e 35 % de B até aos 18 minutos, seguido de ciclos de lavagem de 100% de B e 100 % de A e para equilibrar a coluna usou-se 80 % de eluente A e 20 % de eluente B.

Para análise por espetrometria de massa a amostra foi dissolvida em 500  $\mu$ l ACN + 10  $\mu$ l ácido acético + 490  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Os espectros de massa da amostra e do solvente foram adquiridos em modo positivo num espectrómetro de massa *API-ION TRAP(PO03MS)*.

### 3.3.4 Avaliação da pureza dos péptidos

Para avaliar a pureza de todos os péptidos sintetizados utilizou-se um HPLC analítico (*HPLC LaChrom ELITE, Merck Hitachi*) com uma coluna de fase reversa (*Jupiter 4 micron Proteo 90 A; C12; 250 x 4,60 mm; Phenomenex*). Os eluentes utilizados foram o eluente A: água *Milli-Q*:TFA (100:0,1 v/v) e o eluente B: acetonitrilo:água *Mili-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v), a um fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda analisado foi 220 nm para todos os compostos. O

programa utilizado começa com uma zona isocrática de 65% de eluente A e 35 % de B até aos 8 minutos, seguido de ciclos de lavagem de 100 % de B, durante 2 minutos, 100% de A mais 2 minutos e por fim equilibrou-se a coluna com 65% de eluente A e 35% de eluente B, durante 3 minutos.

### **3.4 Ensaios de inibição**

#### **3.4.1 $\beta$ - Secretase 1**

Os ensaios cinéticos de inibição da BACE1 foram realizados, em eppendorfs num volume final de 180  $\mu$ L, 250 nM de substrato (MCA-Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP) em tampão acetato 20 mM, pH 4,5, com 15% de DMSO e 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich). As reações foram realizadas a 37 ° C (estufa: *WTB Binder ED 240*) durante 2 horas, exceto quando indicado, como no caso do estudo da linearidade da reação. Para os estudos de inibição, a velocidade da reação foi determinada pelo método de ponto final (apenas se usou um ponto em triplicado para a determinação de cada velocidade inicial). Nestes estudos, os inibidores em diferentes concentrações foram pré-incubados com a enzima a 37 ° C durante 15 minutos. As reações enzimáticas foram paradas pela adição de 60  $\mu$ L de solução aquosa de acetato de sódio 2,5 M e agitou-se no vortex a 2500 rpm, antes da análise cromatográfica.

As soluções stock de substrato e de inibidores foram preparadas em DMSO. A percentagem deste solvente orgânico, como referido acima, é de 15% não afetando assim a cinética de inibição (32).

#### **3.4.2 $\beta$ - Secretase 2**

Os ensaios cinéticos de inibição da BACE2 foram realizados em placas de 96 poços de volume reduzido (*Half Area 96 well* da *Corning* ®), num volume final de 81  $\mu$ L, com uma concentração de substrato (MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP) de 250 nM em tampão acetato 20mM pH 4,5, com 15% de DMSO e 1% de Triton X-100. As reações foram realizadas a 37 ° C em condições de primeira ordem, durante 1 hora, exceto quando indicado, como no caso do estudo da linearidade da reação.



Os estudos de inibição foram realizados por pré-incubação com os inibidores nas diferentes concentrações a 37 ° C durante 5 minutos. A velocidade da reação foi determinada por ponto final, sendo que as reações foram paradas pela adição de uma solução stop de 27 µL de solução aquosa de acetato de sódio 2,5 M, e agitou-se no vortex a 2500 rpm, antes da análise.

As amostras obtidas nos ensaios de inibição, de BACE1 e BACE2 foram analisadas por HPLC analítico (*HPLC LaChrom ELITE, Merck Hitachi*) com uma coluna de fase reversa (*Jupiter 4 micron Proteo 90 A; C12; 250 x 4,60 mm; Phenomenex*). Os eluentes utilizados foram o eluente A: água *Milli-Q*:TFA (100:0,1 v/v) e o eluente B: acetonitrilo:água *Mili-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v), a um fluxo de 1 mL/min. O programa inicia numa zona isocrática de 70% de eluente A e 30 % de B até aos 7 minutos, sucedido de ciclos de lavagem de 100 % de B, 100% de A e equilibração da coluna para a próxima injeção com 70% de eluente A e 30% de eluente B, durante 3 minutos. O comprimento de onda utilizado para deteção foi de 323 nm, pois o composto a detetado é MCA-Glu-Val-Asn-Leu, que contém metoxicumarina (MCA) a qual absorve neste comprimento de onda.

Os resultados de inibição dos compostos para ambas as enzimas, BACE1 e 2, foram determinados fazendo um ajuste não linear das velocidades de reação pelo método dos mínimos quadrados usando a equação de Morrison (90)(Equação 3.1), em que  $v$  é a velocidade inicial da reação na presença de determinada concentração de inibidor  $[I]$ ,  $v_0$  é a velocidade inicial de reação na ausência de inibidor,  $[E]$  é a concentração de enzima ativa e  $K_i$  a constante de inibição aparente. Os valores de  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50% da enzima) apresentados, representam a média e desvio padrão de três ensaios independentes.

$$v = v_0 \frac{[E] - [I] - K_i + \sqrt{([E] - [I] - K_i)^2 + 4[E]K_i}}{2[E]}$$

**Equação 3.1**

### 3.5 Ensaios de metabolização

A estabilidade dos compostos foi testada em soro Humano e em suspensão de cérebro de murganho.

O soro foi obtido a partir do sobrenadante de sangue de dador informado, recolhido em tubo estéril sem anticoagulante, que após coagulação (20-30 minutos) foi centrifugado a 20°C, a 1500 g durante 10 minutos.

O cérebro de murganho foi entregue já na forma de suspensão; tendo sido preparada a partir de remoção de um cérebro de um murganho saudável, previamente anestesiado com clorofórmio, ao qual foi adicionado 90% de PBS com 0,5% de Triton X-100. O cérebro foi triturado e homogeneizado com ajuda de um pilão em eppendorff e colocou-se sob ultra-sons durante 10 minutos.

Nestes ensaios foi utilizada uma concentração de 10 µM dos compostos (OM00-3, A, B, C e D) em HBSS (Hank's Balanced Salt Solution pH = 7,4, T = 37 ° C) com 2% de DMSO. Os compostos colocaram-se em contacto com o soro humano e suspensão de cérebro de murganho e homogeneizou-se a amostra incubando-a posteriormente a 37°C. A metabolização foi monitorizada ao longo do tempo, para determinação dos tempos de semi-vida ( $t_{1/2}$ ). Para parar a reação de metabolização precipitaram-se as proteínas com uma solução de 90% de acetonitrilo, 10% de H<sub>2</sub>O e 0,1% de TFA, agitou-se bem a amostra e adicionou-se 33% de HBSS, homogeneizou-se e centrifugou-se durante 10 minutos a 14000g, removeu-se de seguida o sobrenadante e injetou-se a amostra no HPLC analítico (*HPLC LaChrom ELITE, Merck Hitachi*), todos os tempos foram feitos em triplicado.

As amostras de todos os inibidores (OM00-3 e inibidores de A a D) obtidas nos ensaios de metabolização, soro Humano e suspensão de cérebro de murganho, foram analisadas por HPLC analítico (*HPLC LaChrom ELITE, Merck Hitachi*) com uma coluna de fase reversa (*Lichrospher 100 RP-8 5 micron; 100 \* 5 mm; LichroCART*). Os eluentes utilizados foram o eluente A: água *Milli-Q*:TFA (100:0,1 v/v) e o eluente B: acetonitrilo:água *Mili-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v), a um fluxo de 1 mL/min. O programa inicia-se com um gradiente de 70% de eluente A e 30 % de B para 55 % de A e 45 % de B durante 7 minutos, seguido de ciclos de lavagem de 100 % de B, 100% de A e equilibração da coluna para a próxima injeção com 70% de eluente A e 30% de eluente B. Os compostos foram detetados por fluorescência usando os comprimentos de onda de

255 nm para a excitação e de 285 para a emissão de compostos com fenilalanina (OM00-3, inibidores B e D) e de 275 nm para a excitação e de 307 nm para a emissão de compostos com tirosina (inibidores A e C), tendo sido analisados com intensidade média da lâmpada.

Tanto a metabolização em soro humano como em suspensão de cérebro de murganho demonstraram um comportamento de metabolização do tipo bifásico, o qual foi descrito pela Equação 3.2 (91).

$$y = (1 + A) \times e^{-k_1 t} - A \times e^{-k_2 t}$$

### Equação 3.2

Onde  $y$  representa a quantidade relativa de produto inalterado remanescente;  $t$  representa o tempo decorrido de metabolização;  $k_1$  e  $k_2$  representam as duas constantes de metabolização e  $A$  é uma constante de ajuste. Esta equação por comparação com uma adição simplista de monoexponenciais decrescentes, permite restringir a quantidade de produto inalterado ao tempo zero à unidade, pois no tempo zero ainda não ocorreu qualquer metabolização do produto.

A quantidade relativa de produto inalterado foi definida como a razão entre a quantidade de produto remanescente no final de um tempo  $t$  e a quantidade de produto inicial. As constantes de primeira ordem de metabolização e o parâmetro  $A$  foram determinados por regressão não linear, minimizando a soma dos quadrados dos pontos de quantidade de produto residual dos dados experimentais versus os estimados pelo modelo descrito na Equação 3.2. O suplemento Solver do Microsoft Excel 2007 foi utilizado com as seguintes opções: Método de Newton, 100 interações, precisão de  $1 \times 10^{-6}$ , 5% de tolerância e  $1 \times 10^{-4}$  de convergência. A constante de velocidade de inativação de primeira ordem obtidos a partir de regressão linear de  $\ln(y)$  vs tempo foi utilizada como o valor inicial para o parâmetro  $k_1$  da regressão não-linear. Estes valores de tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram determinados por interpolação dos perfis cinéticos de metabolização obtidos sob diferentes condições de metabolização: em soro Humano e em suspensão de cérebro de murganho.

### 3.6 Cultura de células

As células Caco-2 (*Human colon carcinoma cells*) foram adquiridas a *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e *Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen* (Barunshweig, Alemanha). O crescimento celular foi realizado com recurso a meio DMEM rico em glucose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS), inativado por temperatura e 1% de aminoácido não essenciais. As células foram mantidas em monocamada, em frascos de cultura (*T-Flask*) de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37 ° C com 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera humidificada. Todos os meios de cultura de células e suplementos foram obtidos a partir de Invitrogen (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK).

As células de mamífero quando em cultura durante longos períodos de tempo podem ser instáveis, exibindo alterações na morfologia, função e padrão de crescimento (64). Contudo quando adequadamente congeladas, as células permanecem sem alterações na viabilidade bem como noutras características por longos períodos de tempo. Desta forma, um banco de células congeladas permite manter as culturas como uma fonte renovável, para além de que também minimiza o risco de perda da cultura devido a acidentes, como contaminações por microorganismos ou outras linhas celulares (64). Por essa razão as células Caco-2 foram congeladas, em fase de crescimento ativo e isentas de contaminantes, com uma concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL por criotubo. A solução de congelamento utilizado é constituída por 95% de FBS e 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma). As células foram congeladas a uma taxa de arrefecimento de -1°C/min usando 5100 Cryo 1 °C Freezing Container, "Mr. Frosty" (*Nalgene Nunc*). Resumidamente, as células cresceram até à fase exponencial, tripsinizaram-se (0.25% *Trypsin-EDTA*, *Gibco*) para soltar as células do *T-Flask* e em seguida, foram sedimentadas por centrifugação a 200 g durante 10 min a 4°C. As células foram cuidadosamente ressuspensas na solução de congelamento. A suspensão celular foi alíquotada para criotubos (*Nalgene Nunc*). Os criotubos foram então transferidos para o "Mr. Frosty" a -80°C. Após 24 horas, um criotubo foi descongelado para confirmar a eficiência de congelamento. O criotubo foi incubado a 37 ° C e imediatamente após o descongelamento a suspensão celular foi cuidadosamente adicionado a meio fresco num *T-Flask* de 25cm<sup>2</sup>. Após 3 h, o meio do *T-Flask* que contém DMSO foi removido e substituído por meio fresco.

### 3.7 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade de todos os compostos em análise (OM00-3, A, B, C, D e A $\beta$ 1823') foram realizados utilizando células Caco-2 completamente diferenciadas que foram obtidas a partir de um adenocarcinoma de cólon.

Resumidamente, as células foram semeadas a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço em microplacas de 96 poços e o meio de cultura foi permutado a cada dois dias. Após confluência (cerca de 96 horas após o cultivo), as células Caco-2 foram incubadas com diferentes concentrações. As amostras foram diluídas em meio de cultura (DMEM com 0,5% de FBS), sendo as concentrações em teste as seguintes: 2,5 nM, 25 nM, 250 nM, 2,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, tendo sido utilizada esta gama para todos os compostos. As células de controlo apenas continham 100% de meio DMEM suplementado com 0,5% de FBS. Depois de 4 e 24 horas de incubação, o meio foi removido e foi adicionado a cada poço 100  $\mu$ L do reagente colorimétrico (MTS, ensaio de viabilidade celular CellTiter96®, Promega), com uma concentração de 0,5mg/ $\mu$ L. As células foram mantidas durante 4 horas em contacto com o MTS a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera humidificada.

O composto MTS é reduzido por células metabolicamente ativas formando um produto de formazano colorido, que é solúvel no meio de cultura de tecidos. Este produto foi quantificado a partir da absorvância a 490 nm (92) num leitor de placas BioTek™ Power Wave XS. Os resultados foram calculados em termos de percentagem de viabilidade celular em relação ao controlo. As experiências foram realizadas em triplicado.

### 3.8 Quantificação de RAGE, Western Blot

Para confirmação e quantificação da expressão do recetor RAGE, as células Caco-2 foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. As células foram deixadas a crescer em meio DMEM rico em glucose, suplementado com 10% de FBS e 1% de aminoácidos não essenciais, efetuando-se trocas de meio três vezes por semana.

Foram realizadas lises celulares ao longo do período de diferenciação (21 dias) de forma a perceber em que fase de diferenciação é expresso o *receptor for Advanced Glycation Endproducts*

(RAGE). Amostragens proteicas foram realizadas aos 3, 7, 10, 15, 17 e 21 dias após o cultivo. A lise celular foi realizada com CelLytic™ B (Sigma-Aldrich) suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (Calbichem), 200 µL desta solução foram adicionados a cada poço e mantidos durante 5 minutos. As células foram removidas e centrifugadas a 10.000g, durante 10 minutos a 4°C (Hettich Zentrifugen MIKRO 220R), os sobrenadantes foram congelados a -20°C até ao ensaio por Western Blot. A concentração de proteína total foi determinada como descrito no ponto 3.8.1. As proteínas foram separadas por electroforese, como exposto no ponto 3.8.2., e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, 45µm) utilizando um Trans-Blot® Turbo™ Transfer System da BioRad (25 Volt, 1 Ampere, 30 minutos). Após bloqueio com BSA a 1% (w/v) em solução salina tamponada com Tris contendo 0,1% (v/v) de Tween-20 (TBST), a membrana foi incubada durante a noite a 4 ° C com o anticorpo primário contra RAGE (diluição 1:500, anticorpo de coelho da ABGENT) com um pouco de agitação. A membrana foi lavada três vezes durante 5 minutos com TBST e incubada com o anticorpo secundário marcado com HRP durante 1 hora (Visualizer™ Western Blot Detection Kit, Millipore) e revelou-se de acordo com o protocolo do kit de fabrico usando ChemiDoc® da BioRad. As intensidades relativas foram calculadas utilizando software ImageLab® da BioRad.

### **3.8.1 Quantificação de proteína total**

A quantificação de proteína total nos extratos de células Caco-2 foi realizada pelo ensaio do ácido bicinonínico (BCA) com o BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology), utilizando BSA como padrão, de acordo com as instruções do fabricante. Este método combina a redução  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  por proteínas em meio alcalino (método do biureto) com uma deteção colorimétrica sensível e seletiva do catião de cobre ( $\text{Cu}^+$ ), utilizando um reagente contendo ácido bicinonínico. O produto de reação de cor roxa é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um ião cuproso ( $\text{Cu}^+$ ). Este complexo é solúvel em água, exibe uma forte absorvância a 562 nm, sendo praticamente linear com o aumento da concentração de proteína ao longo de uma ampla gama de trabalho (20-2000 µg/mL).

### 3.8.2 Eletroforese

A eletroforese para a separação das proteínas foi realizada sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados géis NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Invitrogen), estes géis são de poliacrilamida e têm um ambiente de pH neutro que minimiza a modificação das proteínas. Todas as amostras foram desnaturadas e reduzidas durante 10 min, a 70 ° C e preparadas de acordo com instruções do fabricante. A eletroforese foi realizada num sistema de eletroforese XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen), utilizando como tampão de corrida o NuPAGE ® MES SDS running buffer (Invitrogen).

## 3.9 Ensaios preliminares de estabilidade na presença de células

Para tentar perceber qual se os compostos interagem com as células Caco-2, inocularam-se placas de 96 poços com uma densidade celular de  $1 \times 10^4$  células/poço e em cada conjunto de poços desenvolveu-se uma série de ensaios, tais como: colocar os compostos em contacto com as células, para determinar se a concentração de composto que desaparece do meio extracelular, bloqueou-se o recetor RAGE, de forma a perceber se tinha interferência na possível ligação dos compostos ao recetor, células cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e A $\beta$ 1823', para tentar estimular a expressão de RAGE e verificar um maior desaparecimento de composto do meio extracelular.

Todos as amostra experimentais obtidas nos ensaios preliminares de estabilidade na presença de células foram analisadas por HPLC analítico (*HPLC LaChrom ELITE, Merck Hitachi*), relativamente ao controlo que não esteve em contacto com a cultura celular. A coluna utilizada era de fase reversa (Gemini-NX 5 micron 110A; C 18; 150 x 4,60 mm; *Phenomenex*). Os eluentes utilizados foram o eluente A: água *Milli-Q*:TFA (100:0,1 v/v) e o eluente B: acetonitrilo:água *Mili-Q*:TFA (90:10:0,1 v/v), a um fluxo de 1 mL/min. O programa inicia em 100% de eluente A até ao 2 minutos, seguido de um gradiente até aos 5 minutos onde se atinge um fração 70/30 de eluente A / eluente B, dos 5 aos 12,5 minutos um gradiente até 50 % de A e 50% de B e por fim ciclos de lavagem de 100 % de B, durante 2 minutos, 100% de A mais 2 minutos. Os comprimentos de onda utilizados para deteção são 255 nm de excitação e 285 de emissão para compostos com fenilalanina (OM00-3, inibidores B e D) e 275 nm de excitação e

307 nm de emissão para compostos com tirosina (inibidores A e C), foram analisados com intensidade média da lâmpada.

### **3.9.1 Ensaios de estabilidade dos compostos em contacto com as células Caco-2.**

Neste ensaio, colocaram-se os compostos (OM00-3, péptidos A e C) em contacto com as células em diferentes concentrações (10  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M e 500 nM) e monitorizou-se ao longo do tempo a concentração de cada composto no meio (0, 15, 45, 90, 240 minutos).

### **3.9.2 Bloqueio do recetor RAGE.**

Para avaliação do impacto do recetor RAGE nos resultados do ensaio anterior procedeu-se ao bloqueio do recetor RAGE com anticorpo policlonal de coelho 0,25 mg/mL de concentração (*RAGE (AGER) Antibody (N-term)*, fornecido por ABEGENT) foi utilizada uma diluição de 1:100. As células foram incubadas com o anticorpo *overnight* em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de aminoácidos não essenciais a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, numa atmosfera 95% humidificada. Após a incubação com o anticorpo anti-RAGE, procedeu-se a duas lavagem com HBSS (Hank's Balanced Salt Solution pH a 7,4, 37 ° C), posteriormente colocaram-se os compostos (OM00-3, A e C) com uma concentração de 2,5  $\mu$ M, e analisou-se a concentração de cada composto no meio extracelular ao fim de 4 horas. Após o ensaio as células foram lavadas duas vezes com HBSS (pH a 7,4, 37 ° C) e lizadas com CellLytic™ B (Sigma-Aldrich) suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (Calbichem), 50  $\mu$ L desta solução foram adicionados a cada poço e mantida durante 5 minutos. Os detritos celulares foram centrifugados a 10.000g, durante 10 minutos a 4°C (Hettich Zentrifugen MIKRO 220R) e posteriormente analisados por HPLC.



### 3.9.3 Células cultivadas na presença de A $\beta$ 1823'.

Para este ensaio utilizou-se uma placa de 96 poços com uma concentração de inóculo de  $1 \times 10^5$  células/poço, as células cresceram durante 8 dias, com meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 2,5  $\mu$ M ou 10  $\mu$ M do ligando A $\beta$ 1823', sendo o meio renovado de 2 em 2 dias. O objetivo deste ensaio consistia em testar o aumento da expressão do recetor RAGE por exposição ao A $\beta$ 1823' uma vez que existem evidências de que a presença de um ligando para o recetor RAGE aumenta a sua expressão celular (50). Antes do ensaio efetuaram-se duas lavagens dos poços com HBSS (pH a 7,4, 37 ° C), de seguida colocaram-se os compostos em teste (A e C) em contacto com as células numa concentração de 2,5  $\mu$ M, e analisou-se a concentração de cada composto no meio ao longo do tempo (2,5, 5, 10, 15 e 30 minutos). Após o ensaio, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (pH a 7,4, 37 ° C) e lizadas com CelLytic™ B (Sigma-Aldrich) suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (Calbichem), 50  $\mu$ L desta solução foram adicionados a cada poço e mantida durante 5 minutos. Os detritos celulares foram aspirados e centrifugados a 10000g, durante 10 minutos a 4°C (Hettich Zentrifugen MIKRO 220R) e posteriormente analisados por HPLC. Resultados não apresentados, pois apresentaram-se inconclusivos.

### 3.10 Ensaio de permeabilidade

Para os estudos de transporte, as células Caco-2 foram cultivadas em transwell® de 12 mm (membrana de polycarbonato, tamanho de poro 0,4  $\mu$ m, *Corning Costar*) com uma densidade de  $3,0 \times 10^4$  células / poço. Os compartimentos basolateral (serosa) e apical (mucosa) continham 1,5 e 0,5 mL de meio de cultura, respetivamente. As células foram deixadas a crescer até à confluência, seguido de diferenciação, aproximadamente 21 dias após o inóculo. O meio (DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácido não essenciais) foi renovado de dois e dois dias até ao dia 14 após inóculo, a partir deste dia até ao dia do ensaio o meio foi renovado diariamente e a resistência elétrica transepitelial (TEER) das monocamadas foi monitorizada utilizando um voltímetro EVOM™ (WPI, Berlim, Alemanha).

Para iniciar o ensaio de permeabilidade o meio foi removido e após duas lavagens com HBSS (pH a 7,4; 37 ° C) os compostos com uma concentração de 25 µM em HBSS (pH a 7,4; 37 ° C), foram adicionados ao lado apical da monocamada celular.

O transporte transepitelial foi seguido ao longo do tempo. Aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> numa atmosfera humidificada, as amostras foram recolhidas a partir do compartimento basolateral e imediatamente analisadas por HPLC, condições de análise iguais às descritas no ponto 3.9.

Os coeficientes de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) dos compostos foram calculados na região de linearidade, utilizando a Equação 3.3:

$$P_{app} = \frac{V}{AC_0} \frac{dC}{dt}$$

### **Equação 3.3**

Onde V é o volume da solução no compartimento basolateral, A é a área de superfície da membrana,  $C_0$  é a concentração inicial do composto apresentado no compartimento apical e  $dC/dt$  corresponde à velocidade de aparecimento do composto teste no compartimento basolateral (93).

## **4 Resultados e Discussão**

---

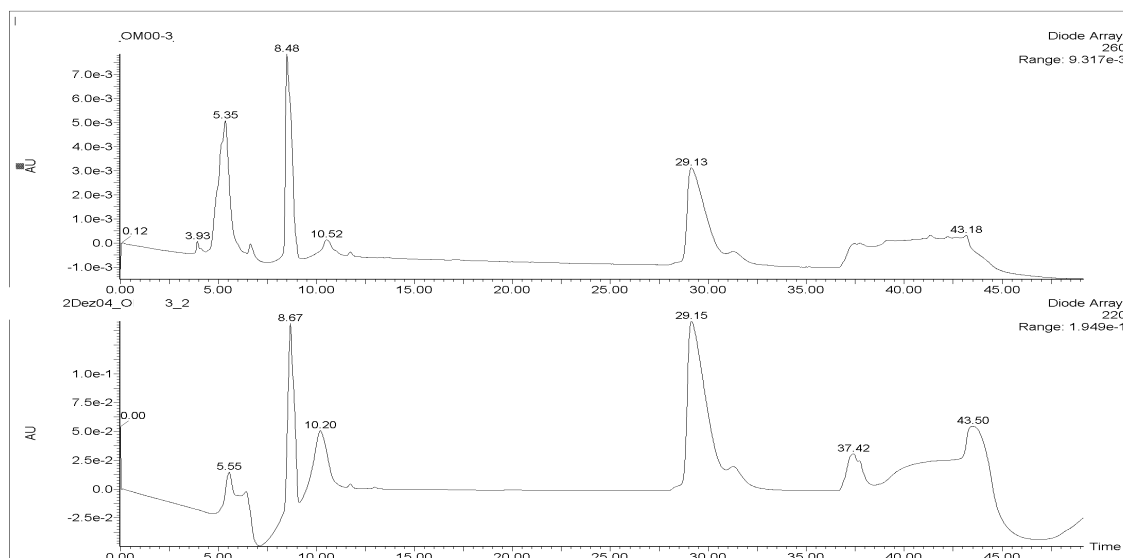


## 4.1 Síntese de péptidos

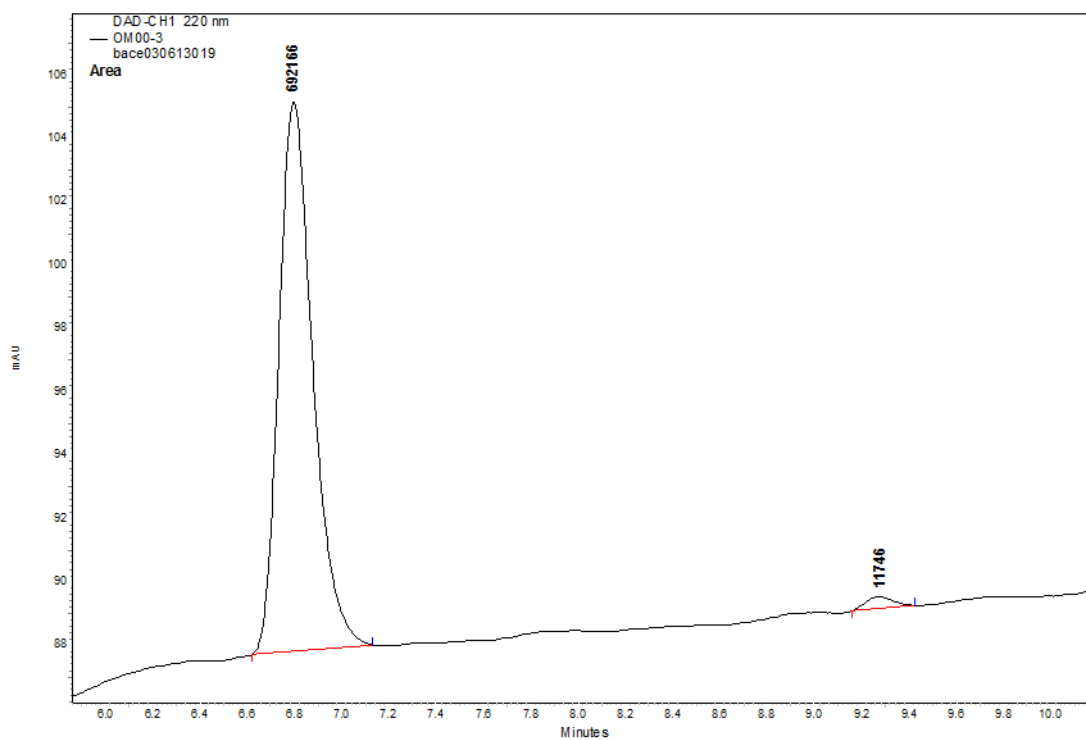
Os péptidos estudados neste trabalho foram obtidos através de síntese em fase sólida com recurso ao Fmoc como grupo protetor. A construção de uma cadeia peptídica através de um suporte sólido insolúvel tem diversas vantagens, tais como a fácil separação dos reagentes excedentários através de uma simples lavagem, o que economiza tempo e trabalho quando comparado com as operações de síntese em solução. Além disso, muitas das operações são passíveis de automatização, e as perdas físicas do péptido de interesse são minimizadas, uma vez que o péptido permanece ligado ao suporte sólido durante toda a síntese (94). Esta abordagem tem contudo limitações, como por exemplo o aparecimento de subprodutos resultantes de reações incompletas que irão permanecer ligados à resina e, assim no final, para além do péptido de interesse poderemos ter péptidos mais pequenos, aos quais faltam algum(s) aminoácido(s), o que pode tornar a purificação do produto mais difícil (94).

A primeira tarefa deste trabalho foi a síntese de um inibidor peptídico de referência, o OM00-3,  $\text{NH}_2\text{-Glu-Leu-Asc-Leu*Ala-Val-Glu-Phe-COOH}$ , onde Leu\*Ala representa o isómero de hidroxietileno (1). O OM00-3 é um inibidor muito potente da  $\beta$ -secretase 1 com uma constante de inibição dentro da escala subnanomolar (0,3 nM) (95), tendo sido considerado promissor para o tratamento da DA. Infelizmente a sua grande dimensão e hidrofília conferida pela sua estrutura peptídica afetam seriamente a sua utilização *in vivo*, não conseguindo atingir o local de ação, o cérebro (96). O propósito de sintetizar este inibidor foi o de obter o melhor comparador atualmente existente para os ensaios de inibição da BACE-1. Este péptido foi sintetizado em fase sólida e purificado em HPLC preparativo (Waters 2535).

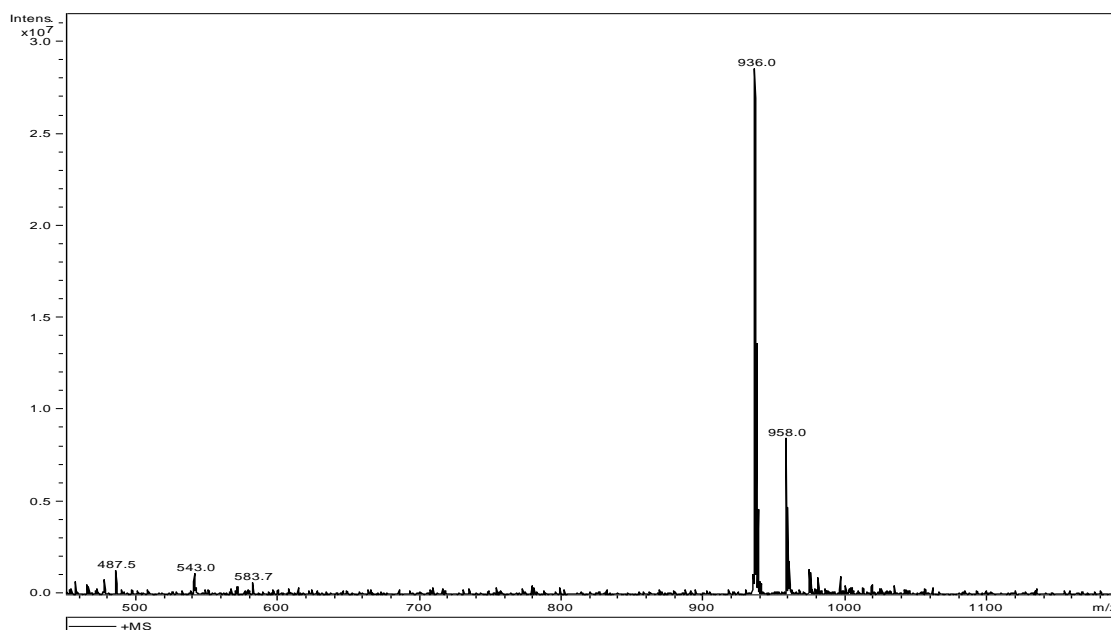
Na Figura 4.1 encontram-se representados os cromatogramas de purificação, analisados nos comprimentos de onda de 260 nm, para detetar fenilalanina e 220 nm para detetar a ligação peptídica, sendo o pico com tempo de retenção de 29,1 minutos, correspondente ao péptido OM00-3. Após a purificação obteve-se um rendimento de 16% e pureza de 99,8% (Figura 4.2), quantificado por HPLC analítico. A análise por espetrometria de massa foi efetuada em modo positivo num espetrómetro de massa *API-ION TRAP(PO03MS)*, sendo o pico maioritário correspondente ao péptido OM00-3, 936,0 g/mol (Figura 4.3).



**Figura 4.1** – Cromatograma de purificação do inibidor OM00-3. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.1.

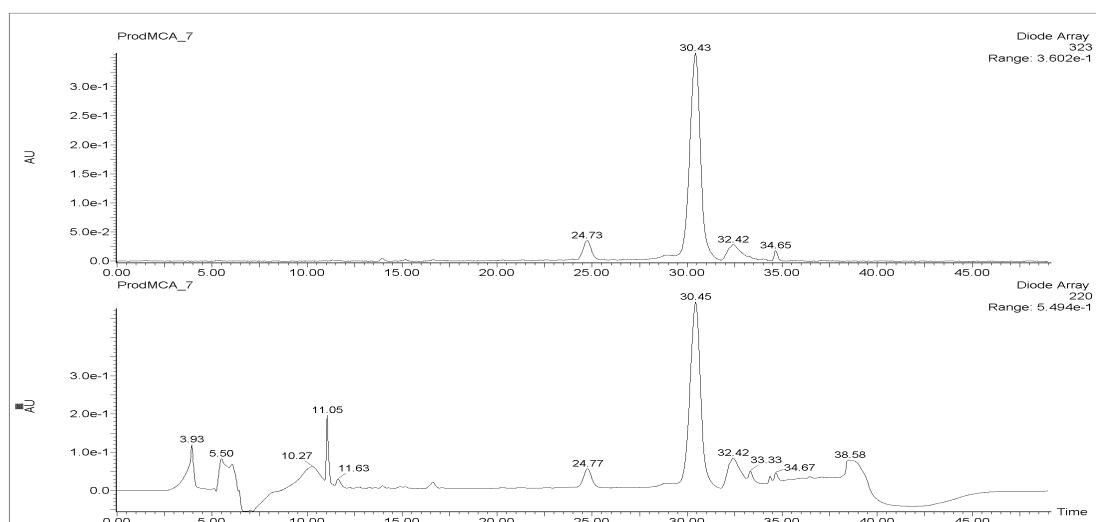


**Figura 4.2** - Cromatograma de HPLC do inibidor OM00-3. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.1.

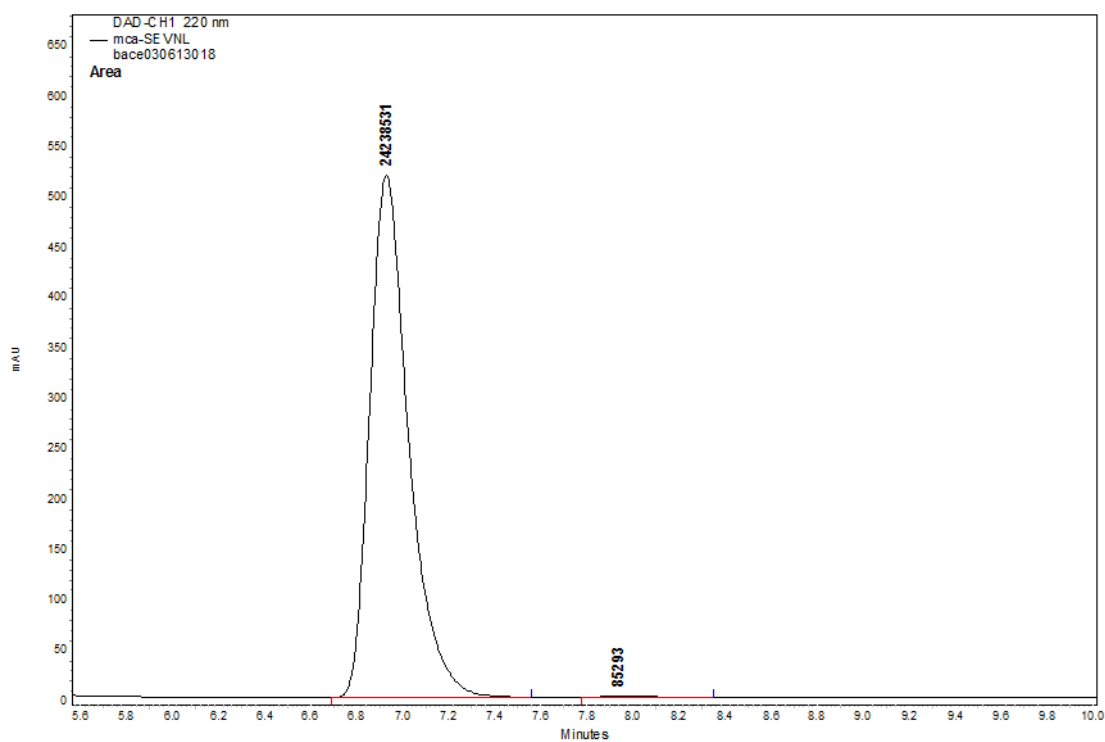


**Figura 4.3** - Espectro de massa do composto OM00-3. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.1.

O péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu foi sintetizado manualmente com recurso à síntese em fase sólida. Este péptido foi utilizado como padrão do produto da reação enzimática entre o substrato fluorogénico (MCA-Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP) e a enzima  $\beta$ -secretase. Por clivagem enzimática pela BACE1 o substrato MCA-Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP, origina dois produtos de reação: MCA- Glu-Val-Asn-Leu e Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP, sendo que o primeiro é fluorescente devido à presença do grupo metoxicumarina (MCA). O cromatograma de purificação encontra-se representado na Figura 4.4, sendo que o pico com tempo de retenção de 30,4 minutos é relativo a MCA- Glu-Val-Asn-Leu e obteve-se um rendimento de 32% e uma pureza de 99,4% (Figura 4.5). O pico de 777.3 g/mol observado no espectro de massa da Figura 4.6 corresponde à massa deste péptido.

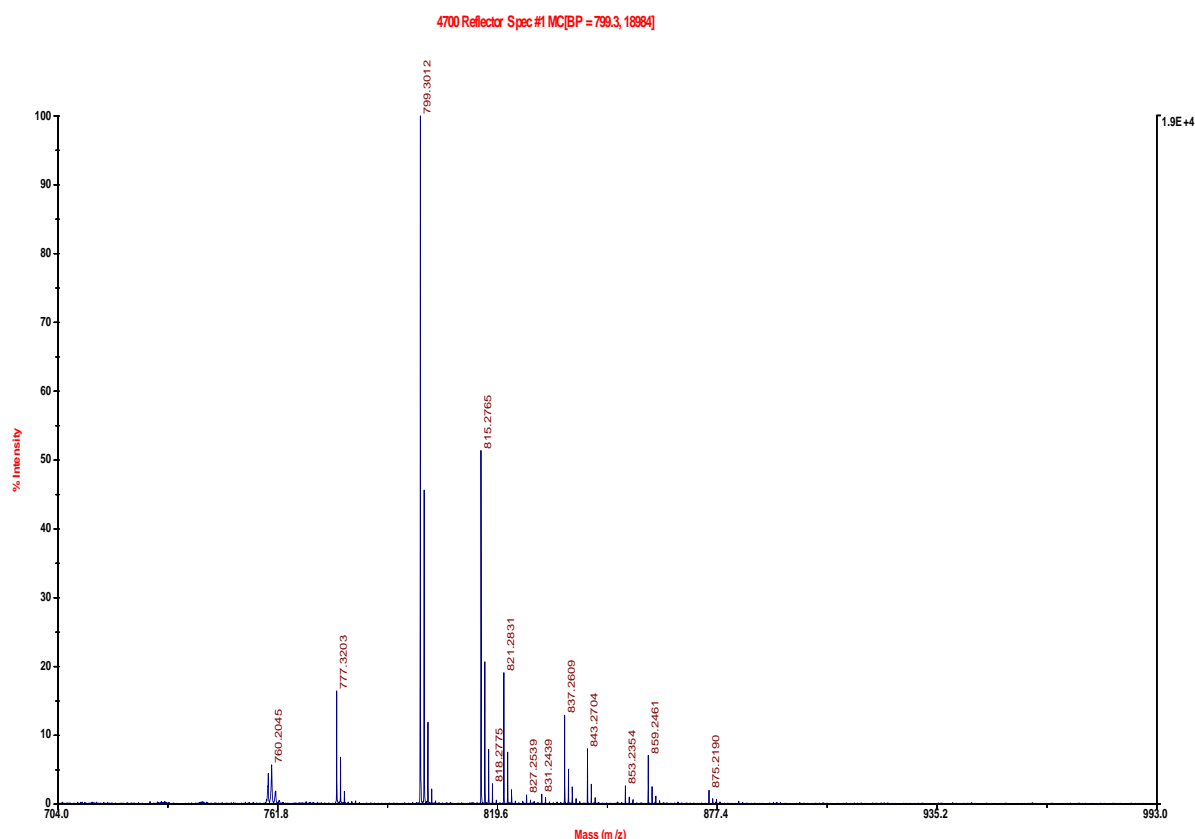


**Figura 4.4** - Cromatograma de purificação do péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.2.



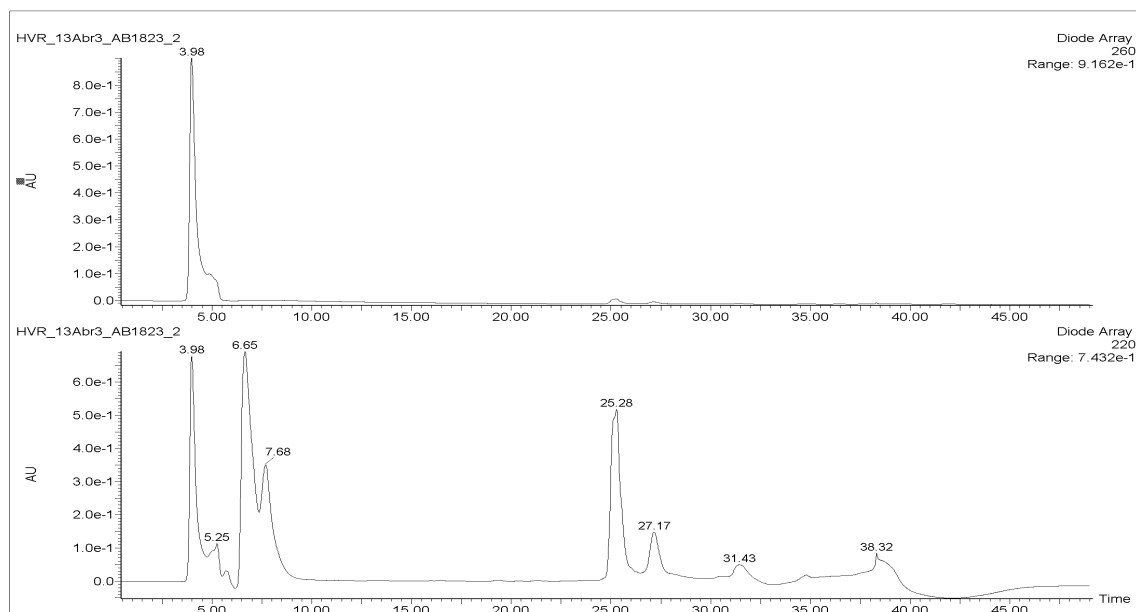
**Figura 4.5** - Cromatograma de HPLC do péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.2.



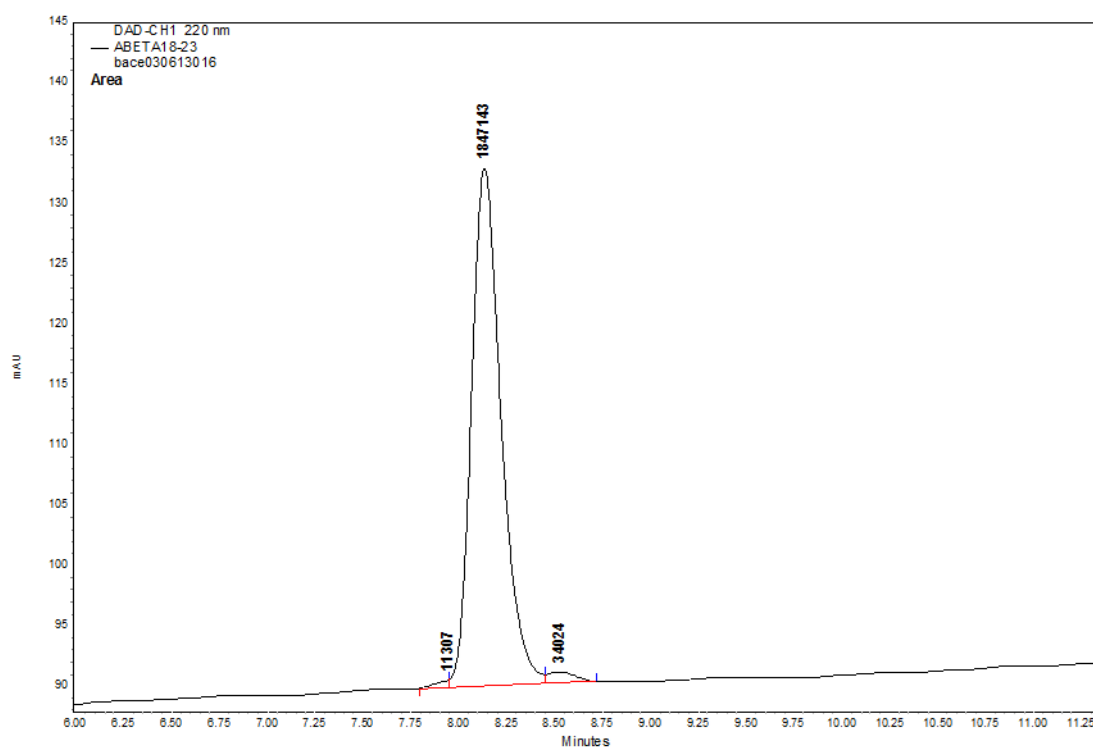


**Figura 4.6** - Espectro de MALDI-TOF do péptido MCA- Glu-Val-Asn-Leu. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.2.

O péptido A $\beta$ 1823' (Ac-Val-Phe-Phe-Glu-Asp) é uma fração do péptido amiloidogénico  $\beta$ A, desde o aminoácido 18 ao 23. A síntese deste péptido foi efetuada num sintetizador automático, no cromatograma de purificação o pico com tempo de retenção de 25,2 minutos corresponde ao composto de interesse, A $\beta$ 1823' (Figura 4.7). Obteve-se um rendimento de 39,8% e uma pureza de 97,6% (Figura 4.8). Na Figura 4.9 está representado o espectro de massa do A $\beta$ 1823', onde existem dois picos de interesse, 768.01 g/mol e 1535 g/mol. O pico de menor massa corresponde à massa molecular do composto enquanto que o segundo corresponde à formação de um dímero deste composto, o qual se forma no próprio processo de análise.

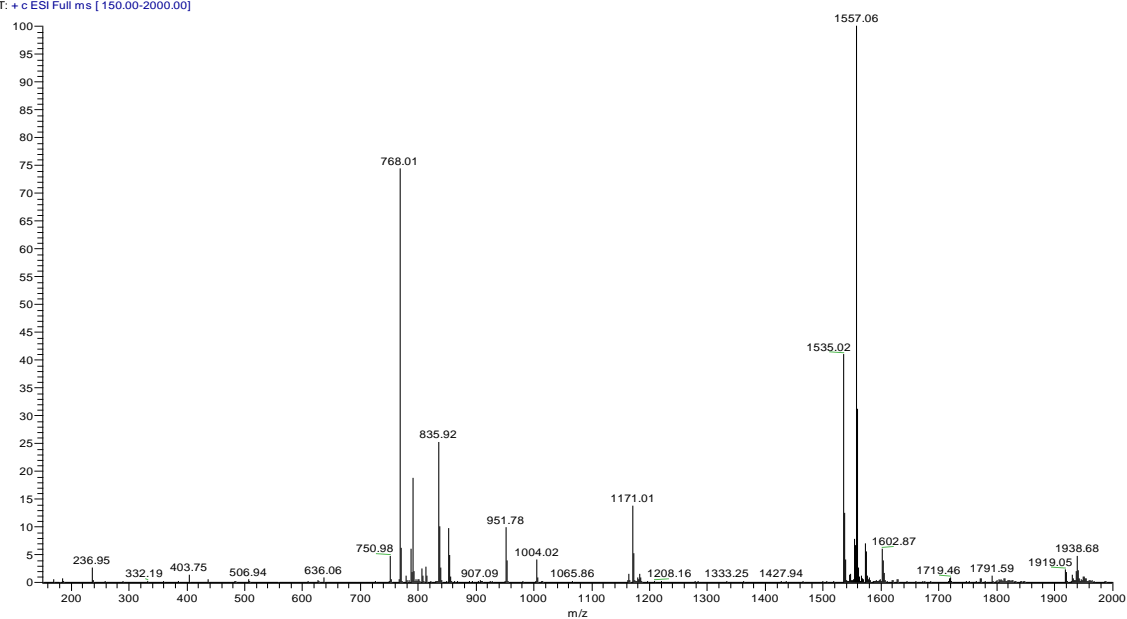


**Figura 4.7** – Cromatograma de purificação do composto A $\beta$ 1823'. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.3



**Figura 4.8** - Cromatograma de HPLC do péptido A $\beta$ 1823'. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.3.

amostra\_pos #2-30 RT: 0.06-0.85 AV: 29 NL: 1.91E8  
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]



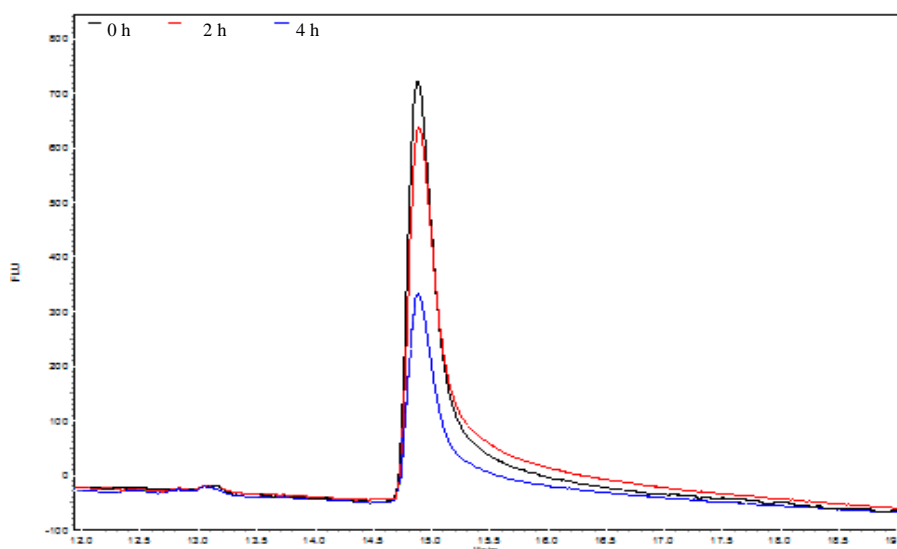
**Figura 4.9** - Espetro de massa do péptido Aβ1823'. Condições descritas no capítulo materiais e métodos ponto 3.3.3.

## 4.2 Ensaios de inibição

Os compostos A, B, C e D são de base peptídica e foram desenhados e sintetizados por um membro do grupo de Farmacocinética e Análise Biofarmacêutica do iBET/ITQB da UNL, com vista a obter um possível fármaco contra a doença de Alzheimer (DA), tendo a enzima  $\beta$ -Secretase 1 como alvo terapêutico e a enzima  $\beta$ -Secretase 2 como alvo a evitar.

### 4.2.1 Otimização de condições de ensaio de inibição

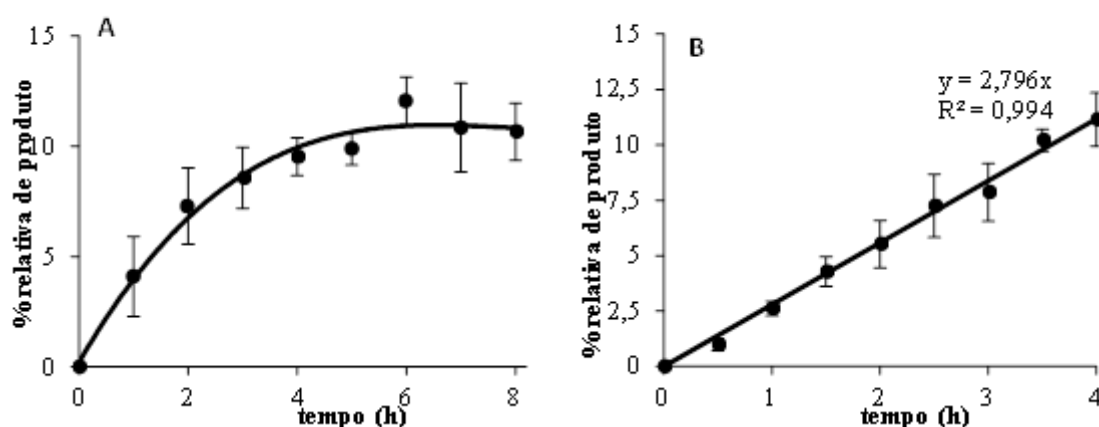
Para a concretização dos ensaios de inibição das enzimas BACE1 e BACE2 foi necessário um longo processo de otimização das condições de reação, sendo que, um dos primeiros obstáculos encontrados foi o da dissolução do substrato (MCA-Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP). Analisando os cromatogramas da Figura 4.10 é possível verificar uma diminuição do sinal referente ao substrato devido a precipitação ao longo do tempo na ausência de solvente orgânico. As condições ótimas para a preparação do substrato são concentrações de substrato inferiores a 250 nM na presença de 15% de DMSO em tampão acetato 20 mM a pH 4,5.



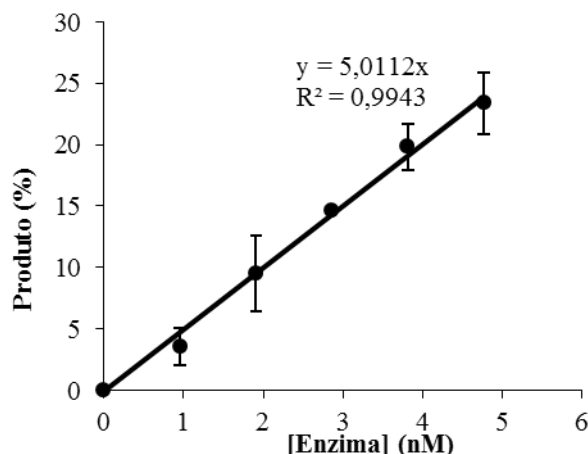
**Figura 4.10** – Monitorização da quantidade de substrato, preparado em tampão acetato, 20mM pH 4,5, por HPLC. Cromatograma preto: solução de substrato (MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP) preparada no momento de injeção; cromatograma vermelho: solução analisada 2 horas após a preparação; cromatograma azul: solução analisado após 4 horas.

Concluído todo o processo de otimização das condições de substrato, procedeu-se à caracterização da estabilidade das enzimas (BACE1 e BACE2). Da Figura 4.11 à Figura 4.14 apresentam-se uma série de ensaios realizados para definir a região de linearidade necessária para efetuar o estudo em si e que pode ser comprometida por diversos fatores como o esgotamento do substrato, a desativação enzimática ou até mesmo inibição pelo produto formado ao longo da reação.

No caso da enzima BACE1, observa-se linearidade da formação do produto em função do tempo durante 4 horas para a concentração de enzima de 2 nM (Figura 4.11B). No que respeita à formação do produto em função da concentração de enzima verifica-se também uma situação de linearidade, mas para um tempo de reação de 2 horas (Figura 4.12). Deste modo, foram assim encontradas as condições adequadas para a determinação da velocidade da reação. Para as reações de inibição foi então utilizada uma concentração de enzima de 2 nM e um tempo de reação de 2 horas.

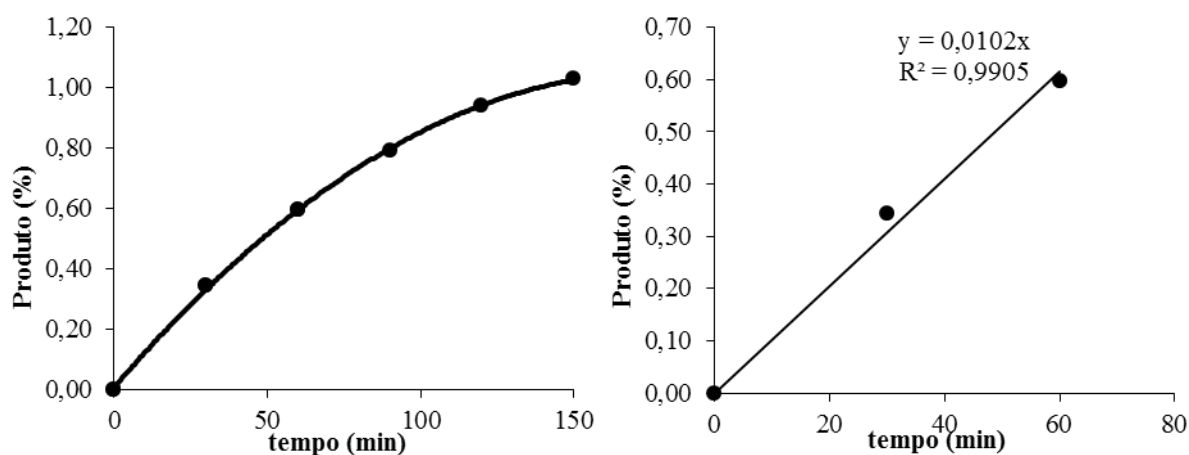


**Figura 4.11** – **A)** Curva de progressão da síntese enzimática do produto MCA- Glu-Val-Asn-Leu , [BACE1]= 5 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100. **B)** Curva de progressão enzimática até ao limite de linearidade [BACE1]= 2 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100.

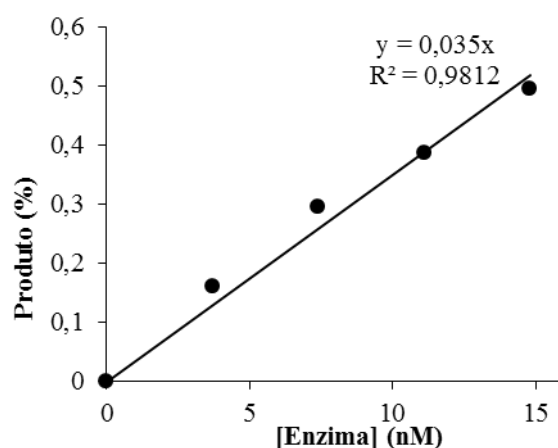


**Figura 4.12-** Dependência da concentração de produto formado com a concentração de enzima BACE1 com [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100, t = 2 horas.

No caso da enzima  $\beta$ -Secretase 2, verificou-se que esta atinge o limite de linearidade mais rapidamente do que a BACE1, muito provavelmente devido à desativação pela temperatura, uma vez que é mais sensível ao calor do que a BACE1, tendo-se considerado a zona de linearidade apenas até à 1 hora de reação (Figura 4.13B). A Figura 4.14, demonstra a linearidade da formação do produto em função da concentração de enzima de uma forma análoga tal como demonstrado para a BACE1. As condições escolhidas para a realização das reações de inibição com esta enzima foram uma concentração de enzima de 7 nM e 1 hora de reação.



**Figura 4.13 – A)** Curva de progressão enzimática, [BACE2]= 7 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100. **B)** Curva de progressão enzimática até ao limite de linearidade, [BACE2]= 7 nM, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100.

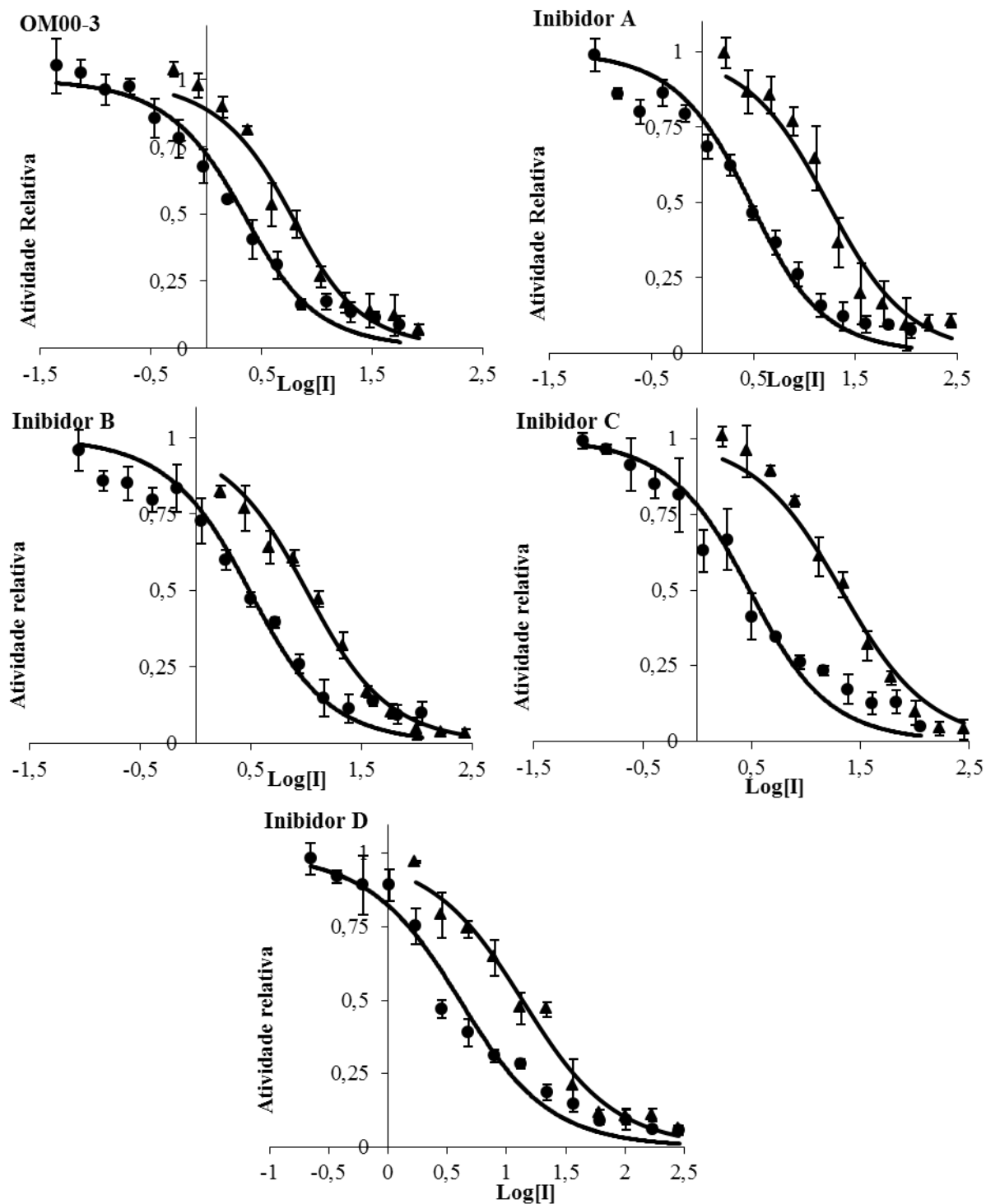


**Figura 4.14** - Variação da concentração de enzima BACE2 com [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM; pH 4,5; 15% de DMSO e 1% de Triton X-100.

#### 4.2.2 Ensaio de inibição e seletividade

Após a otimização das condições reacionais para cada enzima, foram realizados testes para a determinação da potência de inibição de cada inibidor (OM00-3 e inibidores: A, B, C e D) em relação a cada uma das enzimas. O perfil de inibição de cada inibidor em relação às duas enzimas em estudo foi representado num mesmo gráfico (Figura 4.15) por forma a evidenciar a sua seletividade para BACE1 em relação à BACE2. Quanto maior a distância entre os dois perfis maior é a capacidade do inibidor ser mais seletivo para uma enzima em relação a outra.

A potência relativa dos inibidores é normalmente quantificada por comparação das suas constantes de inibição ( $K_i$ ) para a enzima em estudo. Para os inibidores clássicos que são caracterizados por constantes de inibição ( $K_i$ ) muito maiores do que concentração de enzima ( $[E_0]$ ) utilizada no ensaio, esta comparação é facilitada. No caso de inibidores de elevada afinidade (*tight binding inhibitors*) que são caracterizados por valores de  $K_i$  comparáveis em magnitude à concentração de enzima ou mesmo muito inferiores ( $K_i \ll [E_0]$ ) (97) surgem dificuldades em determinar o valor de  $K_i$  (98). Desta forma, para analisar os resultados de inibição nesta tese utilizou-se o modelo de Williams e Morrison (90), que foi desenhado para este tipo de inibidores de elevada afinidade. O procedimento consistiu num ajuste não linear das velocidades de reação pelo método dos mínimos quadrados através da equação de Morrison (Equação 3.1).



**Figura 4.15** – Cinéticas de inibição. Os resultados de atividade são expressos em atividade relativa à obtida na ausência de inibidor. ● [BACE1]= 0,002 U/μL, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM pH 4,5, 15% de DMSO e 1% de Triton X-100, a 37°C. ▲ [BACE2]= 0,01 U/μL, [MCA- Glu-Val-Asn-Leu-Asc-Ala-Glu-Phe-Lys-DNP]= 250 nM em tampão acetato 20 mM pH 4,5, 15% de DMSO e 1% de Triton X-100, a 37°C. Os resultados foram ajustados com recurso ao suplemento Solver do Microsoft Excel 2007.



Neste trabalho foram determinados apenas valores de  $IC_{50}$ , uma vez que a determinação dos valores de  $K_i$  foi dificultada pela baixa solubilidade do substrato em estudo, que não permite atingir concentrações suficientemente elevadas para determinar o valor de  $K_M$  com exatidão, o qual pela equação de Cheng-Prusoff (Equação 4.1), permitiria então sim a determinação dos valores de  $K_i$ .

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)}$$

#### **Equação 4.1**

Onde,  $K_i$  é a constante de inibição,  $IC_{50}$  é a concentração de inibidor que inibe 50% da atividade da enzima,  $[S]$  é a concentração de substrato e  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten.

No que respeita aos ensaios de inibição da enzima BACE1, o composto de referência (OM00-3) (1) é o que apresenta maior poder de inibição com um valor de  $IC_{50}$  de 1,3 nM. Este valor é contudo um pouco dispar do referenciado na literatura e reportado por Turner. *et al* (0,3 nM), facto que se fica a dever não só, a ser um valor de  $IC_{50}$  e não de  $K_i$ , mas também devido a estes autores usarem uma outra isoforma da BACE1 que é constituída unicamente pelo centro ativo. Este facto justifica a menor potência determinada neste trabalho, em que se utiliza a totalidade da enzima, e em que poderá existir algum impedimento estereoquímico de acesso do inibidor ao centro ativo (32). Todos os restantes inibidores tem valores de  $IC_{50}$  muito próximos, entre 2 e 3 nM, ou seja as diferenças estruturais entre os diversos inibidores afetam a sua atividade perante a BACE1 de uma forma mínima e sem diferença estatística quando comparados com a referência (Tabela 4.1).

No caso da enzima  $\beta$ -secretase 2, os inibidores já não se revelam tão potentes, apresentando assim seletividade para a BACE1. Novamente o OM00-3 é o inibidor com o valor de  $IC_{50}$  mais baixo, 3 nM, sendo este também o inibidor com menor seletividade. Os resultados de  $IC_{50}$  dos diferentes inibidores, no caso da BACE2, são mais díspares entre si e apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$ , pela análise de variância (ANOVA)), o que significa que as diferenças estruturais dos inibidores A – D contribuíram para a diferença observada na potência de inibição da BACE2. As diferenças estruturais presentes no inibidor C são aquelas que permitem obter a maior razão entre as potências de inibição entre a BACE2 e BACE1 pelo que será este o inibidor com maior seletividade para a enzima  $\beta$ -secretase 1 em relação à  $\beta$ -secretase 2 (Tabela 4.1).

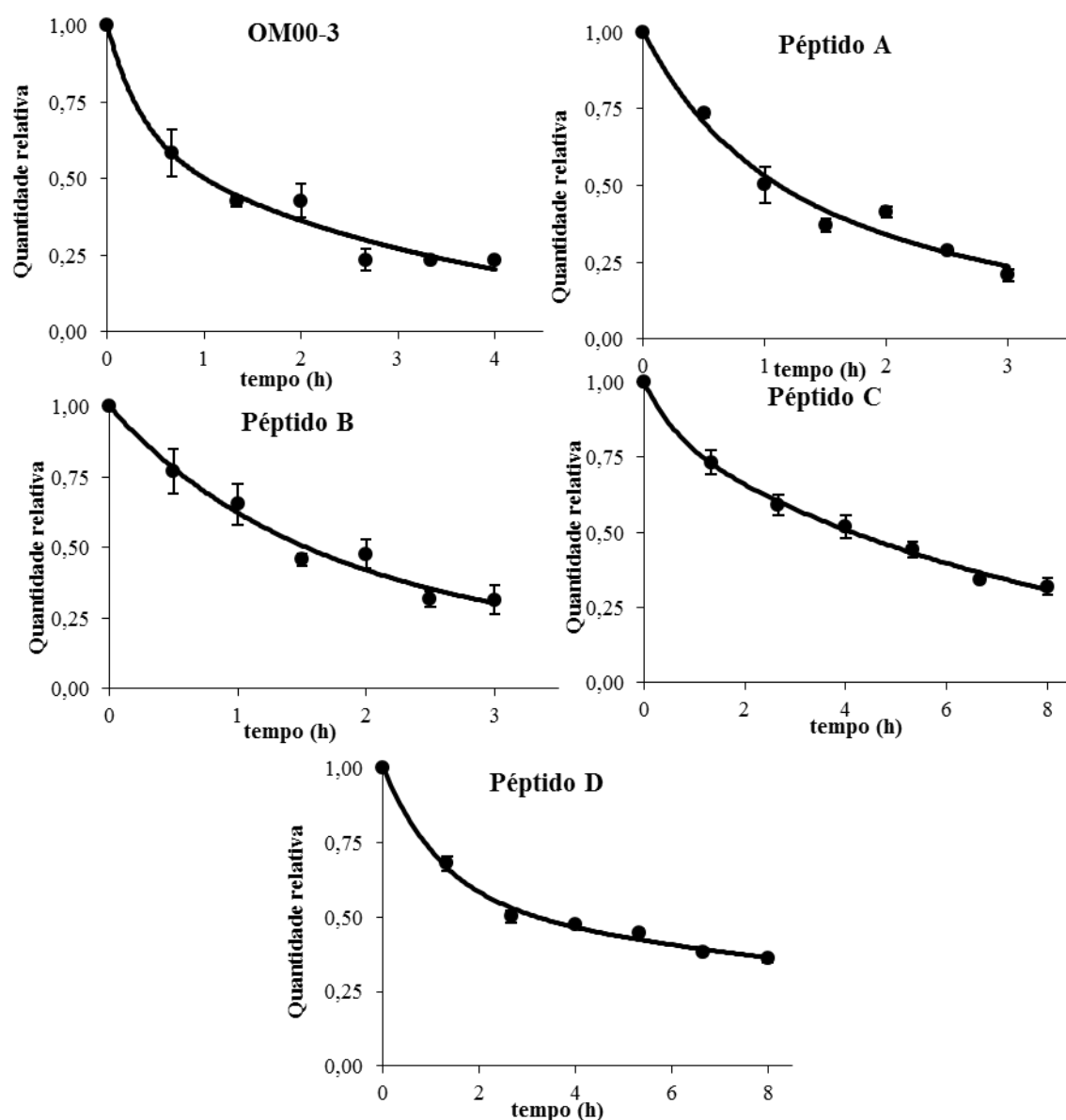
**Tabela 4.1-** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para cada enzima e a respetiva razão.

Inibidor	BACE1		BACE2		Rácio (BACE2/BACE1)
	IC <sub>50</sub> (nM)	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)	R <sup>2</sup>	
<b>OM00-3</b>	1,25 ± 0,38	0,98	3,01 ± 0,30	0,97	2,41
<b>Inibidor A</b>	2,01 ± 0,25 <sup>#</sup>	0,97	14,24 ± 2,16 <sup>#</sup>	0,97	7,08
<b>Inibidor B</b>	2,10 ± 0,09 <sup>#</sup>	0,96	7,28 ± 0,90 <sup>#</sup>	0,99	3,47
<b>Inibidor C</b>	2,15 ± 0,67	0,96	18,28 ± 0,54 <sup>#</sup>	0,98	8,50
<b>Inibidor D</b>	3,10 ± 0,33 <sup>#</sup>	0,97	10,85 ± 1,03 <sup>#</sup>	0,98	3,50

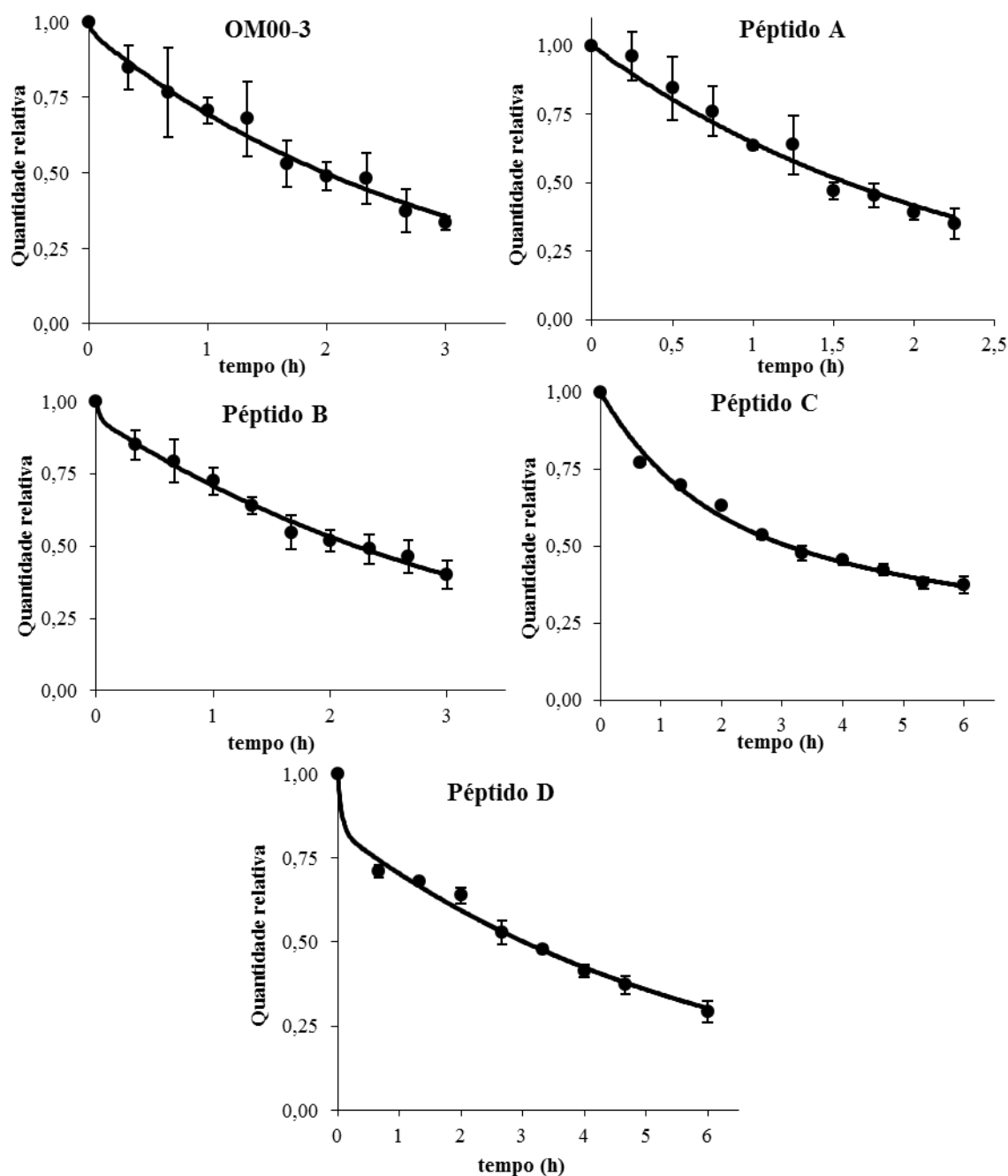
<sup>#</sup>p<0,05 em relação ao inibidor de referência (OM00-3), pelo teste t student.

### 4.3 Ensaios de Metabolização

No processo de desenvolvimento de um fármaco é necessário avaliar a sua estabilidade metabólica. Assim, procedeu-se ao estudo da estabilidade dos compostos OM00-3, inibidores: A, B, C e D na presença de soro humano (Figura 4.16) e de suspensão de cérebro de murganho (Figura 4.17). O ajuste efetuado aos pontos experimentais tem por base um modelo de metabolização bifásico descrito pela equação 3.2 (91).



**Figura 4.16** – Curvas cinéticas de metabolização dos inibidores em soro de humano ao longo do tempo. Os resultados são apresentados em quantidade relativa ao controlo sem metabolização. Condições descritas na secção de materiais e métodos ponto 3.5.



**Figura 4.17** – Curvas cinéticas de metabolização dos inibidores em suspensão de cérebro de murganho ao longo do tempo. Os resultados são apresentados em quantidade relativa ao controlo sem metabolização. Condições descritas na secção de materiais e métodos ponto 3.5.

A maioria dos fármacos são administrados numa dose fixa e em intervalos regulares para atingir a sua eficácia terapêutica. A sua duração de ação depende diretamente do seu tempo de semi-vida plasmática ( $t_{1/2}$ ). Assim, o  $t_{1/2}$  de um fármaco no plasma é um dos principais fatores para se estabelecer a dosagem óptima.

Os inibidores em teste têm por base uma estrutura peptídica podendo ligar-se a proteínas transportadoras no sangue, ou até mesmo entrar nas células do sangue. Esses processos estão em equilíbrio e a internalização dos compostos está dependente da ligação do inibidor à proteína transportadora. Outro fator que pode afetar a chegada de péptidos ao local de ação é o grande número de enzimas, localizadas nas células endoteliais e no plasma, que os metabolizam (48).

Os inibidores C e D foram desenhados de forma a possuírem maior estabilidade, a qual se confirma através destes resultados em soro humano. Os inibidores C e D apresentam tempos de semi-vida de cerca de 3,5 horas (Tabela 4.2), o que é ótimo considerando que são fármacos de natureza peptídica e que por conseguinte têm uma metabolização muito rápida em soro.

No futuro será necessário proceder-se a ensaios em animais, pelo que a determinação da percentagem de metabolização em cérebro de murganho ajudará a decidir qual a dosagem necessária para a viabilidade do ensaio, uma vez que, caso a degradação no cérebro seja elevada, será necessário uma dosagem maior de forma a se conseguir detetar o pico correspondente ao composto em teste por HPLC, bem com obter uma concentração mínima de inibidor para que o fármaco seja efetivo.

Os inibidores C e D são os compostos com melhores resultados de metabolização também na suspensão de cérebro de murganho (Tabela 4.2). Os inibidores C e D são os que se metabolizam mais lentamente muito embora a sua estabilidade diminua ligeiramente em relação ao soro humano. Contudo ainda atingiram um tempo de semi-vida de 3 horas, o que é um ótimo indicador tendo em conta a natureza peptídica dos inibidores que levaria a supor que teriam uma semi-vida muito mais baixa. Adessi *et al.* reporta fármacos peptídicos em extratos cerebrais com valores de semi-vida na ordem de grandeza de minutos apenas (99). Acresce ainda a elevada potência dos inibidores o que faz com que a semi-vida encontrada seja sem dúvida promissora para que se venham a tornar fármacos bastante efetivos. Os inibidores OM00-3, A e B, apresentam uma maior estabilidade na suspensão de cérebro do que no soro, com valores de  $t_{1/2}$  de 1,98; 1,58; 2,20 horas, respetivamente.

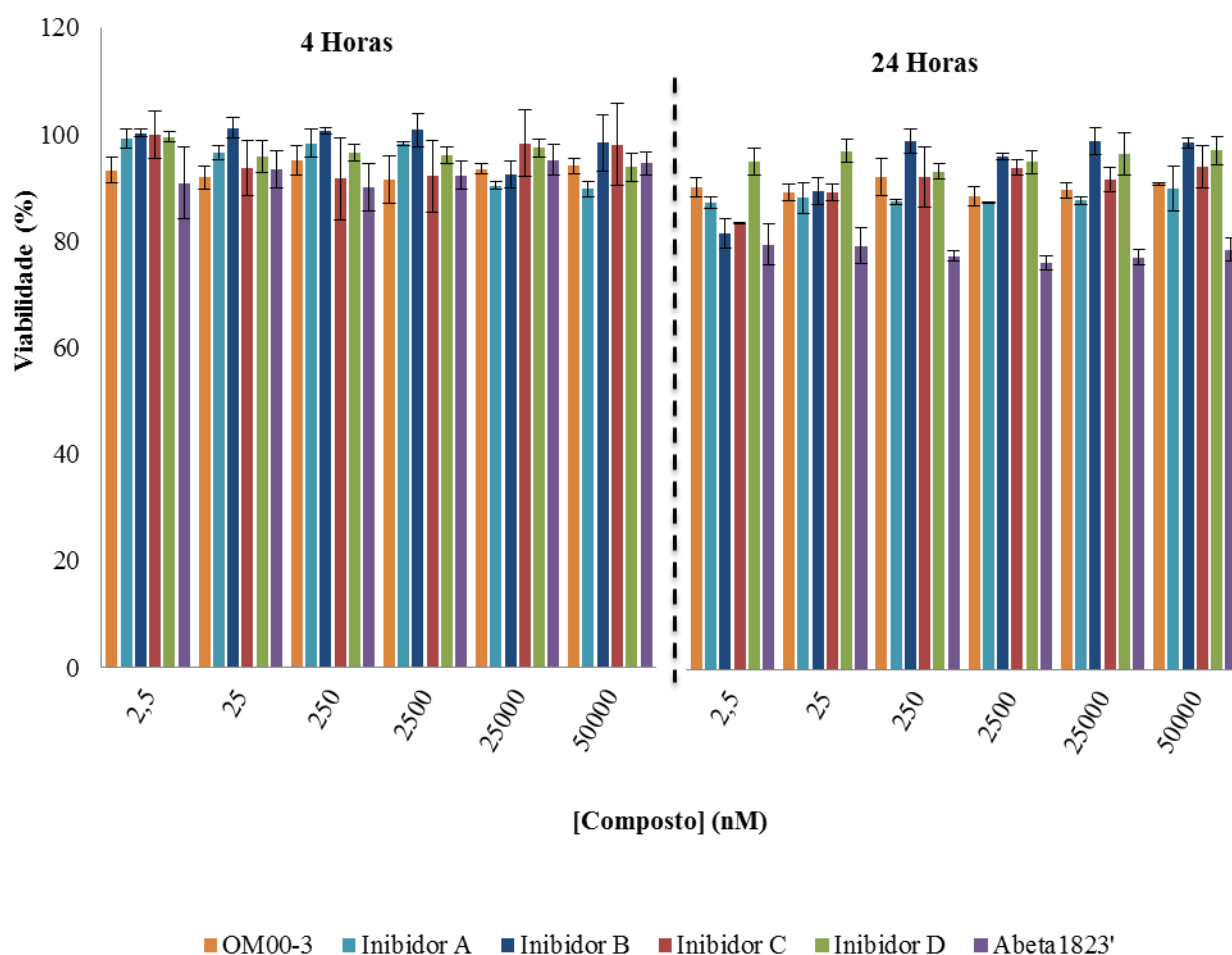
**Tabela 4.2** – Tempos de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) dos inibidores: OM00-3 e A – D, em soro humano e em suspensão de cérebro de murganho, a 37°C.

Inibidor	Soro Humano		Suspensão de cérebro de murganho	
	$t_{1/2}$ (h)	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)	$R^2$
<b>OM00-3</b>	$0,97 \pm 0,23$	0,979	$1,98 \pm 0,21$	0,983
<b>A</b>	$1,12 \pm 0,09$	0,978	$1,58 \pm 0,05^{\#}$	0,970
<b>B</b>	$1,55 \pm 0,05^{\#}$	0,979	$2,20 \pm 0,10$	0,992
<b>C</b>	$4,02 \pm 0,29^{\#}$	0,997	$3,10 \pm 0,14^{\#}$	0,999
<b>D</b>	$3,23 \pm 0,08^{\#}$	0,994	$3,03 \pm 0,10^{\#}$	0,990

<sup>#</sup>  $p < 0,05$  em relação ao  $t_{1/2}$  do OM00-3, pelo teste t student.

## 4.4 Ensaios de citotoxicidade

Antes da realização dos ensaios de permeabilidade é necessário avaliar se os compostos em teste não têm atividade citotóxica nas células a utilizar no ensaio, caso os compostos apresentem toxicidade a integridade da monocamada celular será afetada conduzindo a possíveis falsos positivos. Desta forma, para avaliar a toxicidade dos compostos em teste (OM00-3, A, B, C, D e A $\beta$ 1823') nas células de cancro de cólon humano (Caco-2), procedeu-se a um ensaio onde as células foram submetidas a diferentes concentrações de composto (2,5 nM, 25 nM, 250 nM, 2,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) durante 4 e 24 horas e a viabilidade celular foi avaliada com recurso ao ensaio de MTS (Figura 4.18).



**Figura 4.18** – Avaliação da viabilidade celular após incubação dos inibidores durante 4 e 24 horas em diferentes concentrações de OM00-3, péptidos: A – D e A $\beta$ 1823' nas células Caco-2, a percentagem de viabilidade é calculada através do controlo de células sem adição de compostos. Avaliação da viabilidade celular por MTS.

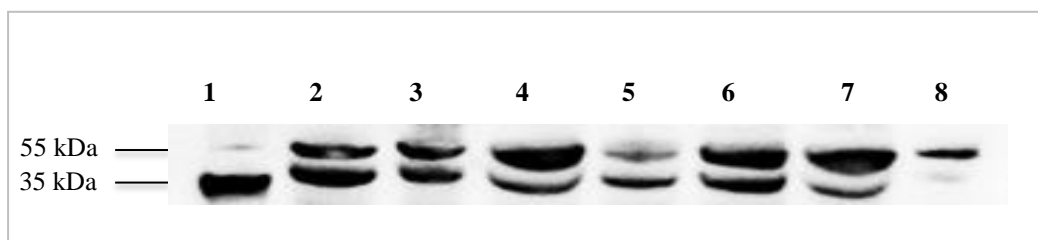
Os tempos dos ensaios foram delineados com uma duração de 4 horas para avaliar a toxicidade dos compostos durante os ensaios de permeabilidade, contudo uma vez que nenhum dos compostos mostrou ter toxicidade nas células Caco-2, optou-se por prolongar o tempo de incubação dos compostos durante 24 horas. Uma vez que os inibidores se tratam de candidatos a fármacos, estes poderão vir a ser administrados por via oral e 24 horas permite cobrir largamente o tempo máximo que o composto estará em contacto com as células epiteliais do intestino. Como é observável na Figura 4.18 os compostos não são tóxicos para as Caco-2 após 24 horas mesmo na concentração mais elevada, 50  $\mu$ M, este resultado já era em si esperado devido às características peptídicas dos compostos.



## 4.5 Confirmação da expressão do recetor RAGE em Caco-2

De forma a perceber em que fase do processo de diferenciação celular é expresso o recetor RAGE nas células Caco-2 fornecidas pela ATCC, procederam-se a lises celulares durante este processo, aos 3, 7, 10, 15, 17 e 21 dias. Foi ainda testada uma amostra de células Caco-2 fornecidas pela DSMZ, com 21 dias de diferenciação, que foram utilizadas como controlo pois segundo Zill *et al.* o recetor RAGE é expresso em Caco-2 da DSMZ (100). A quantidade de proteína aplicada em cada pista foi limitada pela quantidade de proteína total obtida na lise celular de um poço de uma placa de 6 poços, uma vez que o objetivo deste ensaio seria apenas confirmar se o recetor estava a ser expresso nas células Caco-2 ATCC, não havendo a preocupação de todos os poços terem a mesma quantidade de proteína.

Para a caracterização do RAGE ao longo do processo de diferenciação, as células foram lisadas e a concentração de proteína total nos extratos celulares foi determinada por BCA. A expressão de RAGE foi verificada logo numa fase muito precoce de diferenciação e aos 3 dias de diferenciação já se verificava a presença do recetor (Figura 4.19).



**Figura 4.19** - Análise por Western blot da expressão do recetor RAGE em extratos totais de proteínas das células Caco-2 na passagem 34 ao longo do processo de diferenciação. **A)** Pistas **1**. Controlo positivo, 100 ng RAGE comercial; **2**. 21º dia, 177 µg de proteína total das células fornecidas por DSMZ; Nas pistas **3** a **8** foram utilizados extratos celulares de células Caco-2 fornecidas por ATCC: **3**. 21º dia, 177 µg de proteína total; **4**. 17º dia, 177 µg de proteína total; **5**. 15º dia, 85 µg de proteína total; **6**. 10º dia, 177 µg de proteína total; **7**. 7º dia, 177 µg de proteína total; **8**. 3º dia, 17 µg de proteína total; A pista 2 corresponde a células Caco-2 fornecidas por Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (Barunshweig, Alemanha) (DSMZ), que foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS inativado por temperatura, 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Os resultados observados na Figura 4.19, demonstram que o recetor RAGE é expresso tanto nas células Caco-2 da ATCC como nas DSMZ. As células da ATCC e DSMZ provêm ambas do mesmo banco celular, contudo poderiam ter sofrido algumas alterações na sua composição proteica, devido a uma eventual exposição a condições diferentes. No caso específico do RAGE, pela análise dos resultados apresentados não se verificam diferenças na expressão. Em todas as

amostras são visíveis duas bandas, estas correspondem a duas isoformas de RAGE, uma com 55 kDa e outra com cerca de 30 kDa (85). Verificou-se que o recetor é expresso durante todo o processo de diferenciação, este encontra-se presente desde um estado muito precoce uma vez que no 3º dia após inoculo já é visível a presença do recetor RAGE, com maior abundância da isoforma de 55 kDa. O controlo positivo, RAGE da ProSpec é a isoforma de 32 kDa, esta isoforma apenas contém 331 aminoácidos da sequência integral de 404 aminoácidos, sendo a sequência com 404 aminoácidos reportada como detendo 55 kDa de peso molecular (101). A isoforma de menor peso molecular deve-se ao *splicing* do exão 8 na íntegra o que resulta na perda dos domínios transmembranares e citosólicos do recetor RAGE, verificando-se a ausência dos aminoácidos necessários para formar uma proteína transmembranar e, por conseguinte, é provável que seja uma variante solúvel (101). Desta forma, a isoforma de interesse para este trabalho é a que detém a sequências de aminoácidos completa (404 aminoácidos), 55 kDa, uma vez que será essencial que o recetor se encontre à superfície das células para o reconhecimento e transporte dos inibidores em teste.

## 4.6 Ensaios preliminares de estabilidade na presença de células

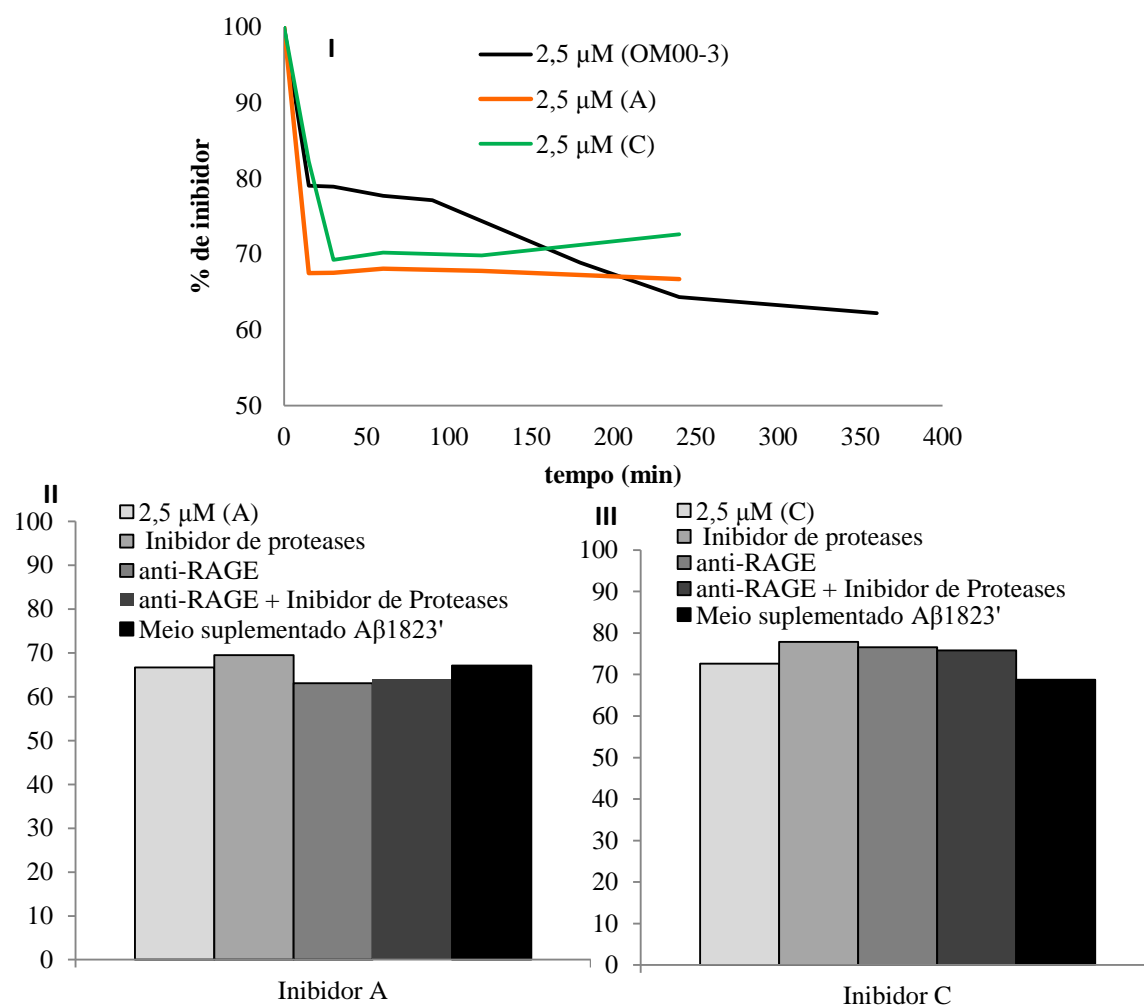
De forma a entender melhor qual o comportamento dos compostos quando em contacto com as células Caco-2, procedeu-se a uma série de ensaios, tais como: colocar os compostos em contacto com as células em placa, bloqueio do recetor RAGE por anticorpo anti-RAGE e por fim células cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 10  $\mu$ M do ligando A $\beta$ 1823' (Figura 4.20).

Inicialmente colocaram-se os compostos em contacto com as células Caco-2 e avaliou-se a sua concentração no meio ao longo do tempo para detetar um eventual decaimento da sua concentração, o que poderia ser devido a metabolização ou internalização. Na Figura 4.20I, analisou-se o composto de referência OM00-3 e os inibidores A e C, sendo que possivelmente o OM00-3 poderá estar a ser metabolizado pelas células, uma vez que tem um decaimento contínuo ao longo do tempo. Em contrapartida, os inibidores A e C têm um decréscimo abrupto, de cerca de 30%, no início e logo depois a sua concentração permanece constante durante 4 horas, pelo que se infere que com este tipo de comportamento o composto não esteja a ser metabolizado ao longo do tempo. Uma hipótese para justificar este comportamento poderá estar relacionada com um tipo de transporte celular espectável para este tipo de compostos, designado de transporte mediado por recetores. É característico deste tipo de transporte a rapidez de entrada nas células devido ao reconhecimento específico pelo recetor, contudo à medida que é internalizado em vesículas de endocitose este deixa de estar disponível para efetuar o transporte, sendo um processo limitado pela disponibilidade do recetor na superfície celular.

De forma a eliminar algumas hipóteses de metabolização dos inibidores por parte de enzimas libertadas para o meio extracelular pelas células, utilizou-se um cocktail de inibidores de proteases conjuntamente com a solução de composto teste. Como se observa nas Figura 4.20II e III o desaparecimento dos compostos do meio extracelular é idêntico ao que não contém inibidor de proteases, pelo que este resultado corrobora a hipótese anteriormente levantada do desaparecimento do composto do meio se dever à internalização na célula ou pelo menos, ligação ao recetor e não a um processo de metabolização.

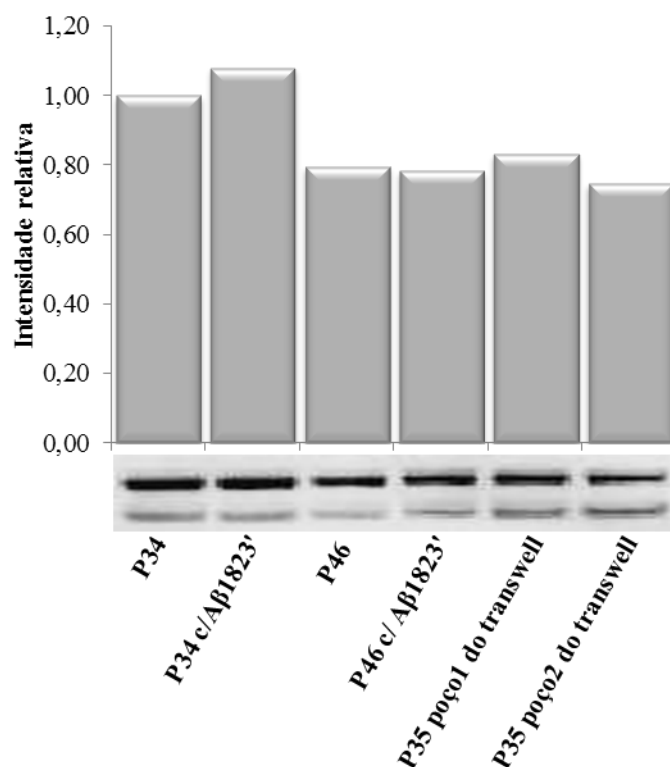
Como acima referido e de acordo com o design específico dos inibidores em estudo infere-se que o transporte dos inibidores mediado pelo recetor RAGE seja de facto possível. No sentido de comprovar esta inferência tentou-se bloquear este recetor com um anticorpo específico, na perspetiva de que a concentração do composto não baixasse ou que o fizesse de uma forma mais

lenta. Todavia, os compostos mantiveram o mesmo comportamento, um desaparecimento de cerca de 30% (Figura 4.20II e III). Uma explicação para este resultado negativo estará relacionada com o facto do anticorpo específico para o RAGE se ligar à extremidade N-terminal do recetor (102), local este que não deverá afetar a possível ligação dos compostos, uma vez que o sítio de ligação dos inibidores é diferente do local de ligação do anticorpo.



**Figura 4.20** – Ensaio indicativo de possível permeabilidade celular. **I)** Composto em contacto com as células Caco-2 numa concentração de 2,5μM em HBSS ao longo do tempo. **II e III)** Ensaio de comportamento dos inibidores A e C com uma concentração de 2,5 μM; Inibidor de proteases: no momento da adição dos compostos adicionou-se inibidor de proteases; anti-RAGE: Células pré-incubadas com anticorpo anti-RAGE; anti-RAGE + inibidor de proteases: célula pré-incubadas com anticorpo anti-RAGE e no momento da adição dos compostos adicionou-se inibidor de proteases; Meio suplementado com Aβ1823': Células crescidas em DMEM suplementado com 10% FBS 1% de aminoácidos não essenciais e 10 μM de Aβ1823'.

Segundo Gospodarska *et al*, sugerem que a sobre expressão de recetor pode ser induzida na presença de ligandos, como por exemplo o péptido A $\beta$ 1823' que possui uma constante de ligação de  $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (50). Na sequência disto, procedeu-se ao crescimento até confluência das células Caco-2 em meio com 10  $\mu\text{M}$  de ligando A $\beta$ 1823'. Este suplemento teve em vista a sobre expressão do RAGE nas células e um possível aumento da percentagem de desaparecimento dos compostos nestas células suplementadas. Porém, mais uma vez os resultados não foram os esperados, mantendo-se o mesmo decréscimo observado que nas células não suplementadas (Figura 4.20II e III). Este facto leva a pensar que, caso os inibidores estejam a ser transportados pelo recetor RAGE, o ligando A $\beta$ 1823', aparentemente não está a promover a sobre expressão do recetor, ou pelo menos não o faz do lado apical da membrana, pois Shirasawa *et al*. descreveram a localização do RAGE na membrana basolateral das células diferenciadas da linha celular ATI, que são células epiteliais alveolares pulmonares do tipo I (103). Neste sentido para despistar esta situação avaliou-se a quantidade de recetor RAGE expresso em diversas passagens e condições de crescimento suplementando com o ligando A $\beta$ 1823'. Na Figura 4.21, encontra-se a quantificação do recetor RAGE por Western Bolt em diversas passagens e condições de crescimento. Verificou-se assim que o suplemento do meio de cultura com o ligando A $\beta$ 1823' durante o período de crescimento e diferenciação, aparentemente não afeta a expressão do recetor nas células Caco-2, no caso de células com menor número de passagens, passagem 34, observa-se um ligeiro aumento, contudo não é uma diferença determinante para se assumir uma sobre expressão.



**Figura 4.21**– Intensidades relativas do recetor RAGE por Western Blot, calculadas utilizando software ImageLab® da BioRad **P34** – Célula na passagem 34; **P34 c/ Aβ1823'** – Células na passagem 34 cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 10 μM de Aβ1823'; **P46** – Célula na passagem 46; **P46 c/ Aβ1823'** – Células na passagem 46 cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de aminoácidos não essenciais e 10 μM de Aβ1823'; **P35 poço1 do transwell** – Células inoculadas em transwell de policarbonato de 12 poços, amostra 1; **P35 poço2 do transwell** – Células inoculadas em transwell de policarbonato de 12 poços, amostra 2; Os valores de intensidade são relativos ao da Passagem 34, uma vez que foi nesta passagem que se obteve o resultado positivo de permeabilidade.

## 4.7 Ensaios de Permeabilidade

No sentido de avaliar a permeabilidade dos inibidores em estudo na barreira hematoencefálica, utilizou-se um modelo de células de adenocarcinoma do cólon humano, Caco-2.

Como se verificou por Western Blot (Figura 4.19), esta linha celular expressa o recetor que poderá ser responsável por mediar o transporte dos inibidores A, B, C e D. Desta forma, procedeu-se a ensaios de permeabilidade em placas transwell de 12 poços com membrana de policarbonato.

**Tabela 4.3** – Permeabilidade aparente (Papp) dos inibidores A e C e os controlos positivo (cafeína, Papp =  $1,35 \times 10^{-5}$  cm/s (104) e negativo (amarelo de Lúifer, até Papp =  $0,6 \times 10^{-6}$  cm/s (105) para o poço transwell correspondente em células Caco-2 (passagem 34) em monocamada na direção apical – basolateral. \* - diferença percentual entre replicados.

	Papp (cm/s)		Papp (cm/s)
<b>Inibidor A</b>	$3,82 \times 10^{-5}$	Controlo +	$2,07 \times 10^{-5}$
	(135%)*	Controlo -	$3,41 \times 10^{-8}$
<b>Inibidor C</b>	$3,49 \times 10^{-5}$	Controlo +	$3,14 \times 10^{-5}$
	(75%)*	Controlo -	$5,41 \times 10^{-7}$

A avaliação da permeabilidade dos inibidores A – D foi incompleta, não tendo sido possível determinar a permeabilidade dos inibidores B e D. Os inibidores A e C de acordo com ensaios preliminares, em que apenas se efetuou o ensaio em duplicado, demonstram ser muito permeáveis (Tabela 4.3), estando referenciado que permeabilidades aparentes superiores a  $5 \times 10^{-6}$  cm/s são consideradas permeabilidades altas (104). Estes resultados dão muito boas indicações acerca da sua capacidade para permear a membrana de células Caco-2, apesar da grande variabilidade observada. Infelizmente não foi possível reproduzir estes resultados noutros ensaios independentes, tornando-se por isso estes resultados meramente indicativos e não suportados do ponto de vista estatístico, razão pela qual também não se conseguiu determinar valores de permeabilidade para os inibidores B e D, que foram testados mais tarde. Há contudo que colocar a hipótese destes ensaios preliminares representarem um falso positivo, porém foram efetuados testes que corroboram um resultado verdadeiro tendo-se verificado a integridade da monocamada através de dois controlos, usando a cafeína como controlo positivo e o amarelo de Lúifer como

controlo negativo. Caso existissem danos na monocamada de células que permitissem a passagem dos compostos sem ser pelas células, a permeabilidade do amarelo de Lúifer seria superior a  $0,6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  (105), o que não se verifica. Simultaneamente a permeabilidade observada para a cafeína apresenta valores próximos do esperado. Pressupõem-se portanto que a monocamada se encontrasse íntegra e que dificilmente estes resultados sejam um falso positivo.

Adicionalmente há a acrescentar que a permeação observada para os inibidores A e C apresentou uma extensão reduzida (aproximadamente 10%), o que em si mesma corrobora a hipótese da permeação da membrana estar a ocorrer por um processo de endocitose mediada por receptores. Ou seja, o processo é em si um processo rápido como indicam os elevados valores de permeabilidade aparente calculados, mas ao mesmo tempo é um processo limitado pela quantidade de recetores existentes à superfície da membrana apical e daí resultar numa permeação com baixa extensão.

Posto isto, levantaram-se questões com vista a explicar o insucesso da replicação dos resultados tais como a possibilidade de nos ensaios posteriores, em que o resultado foi negativo, poderem estar a formar-se multicamadas celulares dificultando o transporte dos compostos (106), e também o facto da passagem usada para estes ensaios ser elevada e poder ter havido uma alteração na expressão do recetor RAGE.

### **Hipótese 1:** Formação de multicamadas de células.

Um indicador da formação de multicamadas celulares é o aumento da resistência transepitelial (TEER), dado que também se formam TJs entre as camadas (107). Os valores de TEER obtidos em todos os ensaios realizados foram elevados, sendo mesmo superiores a  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Contudo, é pouco provável que tenha ocorrido a formação de multicamadas ou que esse facto tenha sido decisivo na falta de reprodutibilidade, pois o ensaio em que o resultado de permeabilidade deu positivo também tinha TEERs elevadas. Segundo Yu *et al.* (108) a densidade celular e a resistência transepitelial aumentam a partir da passagem 29. Adicionalmente, também o facto do valor determinado para a permeabilidade aparente da cafeína se encontrar dentro de uma gama de valores esperados não é indicativo da formação de multicamadas.



**Hipótese 2:** Alteração dos níveis de expressão do recetor RAGE com o aumento da passagem celular.

As condições de cultura como a densidade celular do inóculo e o número de passagem influenciam o fenótipo das células Caco-2 (109). O aumento do número da passagem nas células Caco-2 influencia a atividade de enzimas, a morfologia, a TEER, a taxa de proliferação celular, a densidade, as atividades de transporte mediadas e as atividades metabólicas (84, 110).

Foi então realizada a quantificação do recetor RAGE na linha celular utilizada para o ensaio em diferentes passagens e condições de cultura (Figura 4.21). Entre a passagem 34 e as passagens 35 e 46 é visível uma ligeira diminuição da quantidade de RAGE (20%), contudo, esta pequena diferença não deverá influenciar os resultados significativamente. Analisou-se ainda se as células de um mesmo transwell apresentavam variabilidade na expressão do recetor (Figura 4.21, P35 poços 1 e 2 do transwell), caso este que não se verificou.



## **5 Conclusão e Propostas Futuras**

---



Neste trabalho foram desenvolvidos uma série de ensaios para testar possíveis fármacos para a doença de Alzheimer (DA), compostos A, B, C e D. Estes fármacos têm como alvo terapêutico a enzima  $\beta$ -secretase 1, esta enzima é a principal responsável pela DA, uma vez que cliva a APP e leva à produção do péptido neurotóxico  $\beta$ -amilóide (6).

De forma a determinar se os compostos A, B, C e D desempenhavam a função pretendida, inibição da enzima BACE1, procedeu-se a ensaios cinéticos de inibição. Onde se concluiu que todos os compostos são inibidores com elevada afinidade (*tight binding inhibitors*), pois têm valores de  $IC_{50}$  na escala nanomolar (entre 2,1 nM para os inibidores A, B e C e 3,1 nM para D). Comparando o inibidor C com o inibidor de referência, OM00-3, o qual apresentou um valor de  $IC_{50}$  de 1,3 nM, quando analisado nas mesmas condições dos inibidores em teste, verificou-se que a potência de inibição de ambos não apresenta diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4.1).

Como se tratam de inibidores da enzima  $\beta$ -secretase 1, é importante testar a sua seletividade, uma vez que a  $\beta$ -secretase 2 apresenta 64% de homologia na sequência de aminoácidos com a BACE1 (21). A enzima BACE2 está envolvida na libertação e produção de insulina no pâncreas (38) e pensa-se que poderá evitar a agregação do péptido  $\beta$ -amilóide (40), desta forma é fundamental que estes inibidores apresentem seletividade para BACE1, com o objetivo de não interferir na ação da BACE2. Os resultados obtidos no teste de seletividade demonstraram seletividade para a BACE1 para todos os inibidores. Dos inibidores em análise o inibidor C é o mais seletivo, apresentando uma razão BACE2/BACE1 de 8,5 que em comparação com o inibidor de referência, OM00-3, com uma razão de 2,3, representa um progresso muito significativo numa ordem de magnitude de 4 vezes na seletividade para a BACE1 em relação à BACE2 (Tabela 4.1).

No desenvolvimento de fármacos, é importante determinar a sua estabilidade metabólica e toxicidade. Nenhum dos inibidores apresentou níveis de citotoxicidade em células Caco-2 com uma concentração de 50  $\mu$ M durante 24 horas. Quanto à sua estabilidade metabólica em soro de Humano e suspensão de cérebro de murganho, aparentam ter boa estabilidade tendo-se obtido tempos de semi-vida na escala de horas. O que é bastante favorável, uma vez que este tipo de compostos, péptidos, apresentam por vezes valores de tempo de semi-vida na ordem de grandeza de minutos apenas (48, 99). Acresce ainda a sua elevada potência o que faz com que o tempos de semi-vida encontrados seja sem dúvida promissores para que estes compostos se possam tornar fármacos bastante efetivos. De todos, o inibidor C foi o que se revelou mais estável tanto em soro Humano como em suspensão de cérebro de murganho,  $4,02 \pm 0,29$  e  $3,10 \pm 0,14$  horas respetivamente (Tabela 4.2).

Os resultados dos ensaios preliminares em placa com células são indicativos de um decréscimo da concentração de compostos (A e C) do meio extracelular que poderão estar a ancorar na membrana ou a ser internalizados nas células Caco-2. No que respeita aos ensaios de permeabilidade feitos em placas transwell com as células Caco-2, os resultados iniciais indicaram que os compostos seriam permeáveis, contudo não foi possível prová-lo consistentemente, uma vez que o resultado obtido no ensaio positivo não se conseguiu reproduzir. Foram realizados cinco ensaios de permeabilidade, onde um dos ensaios apresentou permeabilidade aparente para os inibidores A e C de  $3,82 \times 10^{-5}$  cm/s e  $3,49 \times 10^{-5}$  cm/s, respetivamente, os quais muito dificilmente serão fruto de um resultado falso positivo, tendo-se assegurado adequadamente a integridade da membrana, não permitindo a passagem dos inibidores sem ser através da camada de células (Tabela 4.3). A extensão da permeabilidade foi de aproximadamente 10% o que corrobora uma permeação destes inibidores por transcitose mediada por recetores, uma vez que dependendo da quantidade de moléculas a transportar e no caso de ser uma quantidade elevada pode ocorrer um esgotamento do recetor que se encontra disponível à superfície da membrana, inibindo desta forma o transporte.

Nos quatro ensaios de permeabilidade restantes não foi possível observar qualquer permeabilidade de nenhum inibidor, nestes ensaios foram testados todos os inibidores de A-D, incluindo os inibidores que anteriormente já tinham apresentado bons níveis de permeabilidade. De forma a despistar algumas hipóteses que poderiam estar a levar a estes resultados foram realizados diversos testes.

Antes de realização dos ensaios de permeabilidade confirmou-se a presença do recetor RAGE nas células Caco-2. Mas como estes ensaios foram feitos em células de passagens diferentes, colocou-se a questão da expressão do recetor RAGE estar a ser afetada com a passagem celular, ou com as condições de crescimento e diferenciação em placa transwell com membrana de polycarbonato, uma vez que a expressão proteica pode ser influenciada por condições de cultura e tipo de membrana (109). Na Figura 4.21 é visível que a expressão do RAGE não é afetada por nenhuma destas condições, aparentemente existe a mesma quantidade de recetor na passagem 34, passagem em que foi feito o ensaio com resultados positivos, que nas passagens 35 e 46, sendo que as células da passagem 35 cresceram e diferenciaram-se em transwell. Na Figura 4.21, também é possível verificar que contrariamente ao descrito por Gospodarska *et al.* (50) a presença do ligando A $\beta$ 1823' durante o crescimento e diferenciação das células não leva a uma sobre expressão do RAGE nas células Caco-2.

Nos ensaios de permeabilidade após o término do ensaio foi recolhida uma amostra do compartimento apical de forma a contabilizar a percentagem de composto que desapareceu

deste compartimento. Nestes quatro ensaios com resultados negativos, no fim do ensaio permanecia no lado apical toda a quantidade de composto colocada inicialmente, perante isto descarta-se a hipótese de que os inibidores possa ter sido metabolizados, podendo antes indicar a existência de algum fator que impede a internalização dos compostos. Uma possível causa, poderá estar relacionada com uma possível agregação dos compostos quando armazenados no frio. A estrutura destes inibidores tem propensão para formar agregados de uma forma análoga ao péptido beta-amilóide e na realidade observou-se agregação dos inibidores quando armazenados em HBSS a 4°C e a -20°C durante um mês. Todavia, num dos ensaios negativos as soluções foram preparadas imediatamente antes do ensaio, com o tampão HBSS previamente aquecido a 37°C, e obtiveram-se soluções com um aspeto límpido e translúcido, pelo que se pensa que não tenham agregados, pelo menos nas mesmas dimensões que os observados na soluções armazenadas. Mesmo assim o resultado deste ensaio, com as soluções preparadas na hora do ensaio, foi negativo.

No sentido de excluir problemas relacionados com o modelo *in vitro* usado para estudo da permeabilidade, procedeu-se a um ensaio preliminar *in vivo* em parceria com a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O inibidor C foi o escolhido de entre os inibidores em estudo por ser o mais potente, não sendo estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) da potência observada para o OM00-3 que é composto mais potente reportado na literatura. O inibidor C foi também o que apresentou maior seletividade para a BACE1 em relação à BACE2 e maior estabilidade contra a metabolização. A administração intravenosa do inibidor C em murganhos conduziu a resultados promissores, indicando que o composto chega efetivamente ao órgão alvo, o cérebro. Este resultado apoia a hipótese de que o tipo de estrutura presente nos compostos em estudo permite permear a barreira hematoencefálica. Deste modo o ensaio de permeabilidade em células Caco-2 com resultados positivos, muito provavelmente não é um falso positivo, existe sim uma variável ainda não controlada que não permitiu assegurar a reprodutibilidade do ensaio.

Um fator adicional que poderá estar a comprometer a permeabilidade dos inibidores é a localização do recetor RAGE na membrana plasmática. Com os ensaios de quantificação do RAGE por Western Blot, confirma-se que o recetor está ser expresso nas células Caco-2, contudo não nos permite concluir acerca da sua localização. Pelo que seria interessante no futuro realizar ensaios de permeabilidade na direção basolateral – apical, uma vez que se o recetor se encontrar na membrana basal permitirá a passagem dos compostos para o compartimento apical e/ou recorrer a microscopia confocal para determinar a localização do recetor RAGE nas células Caco-2 após a diferenciação e polarização das células para verificar

que este se encontra uniformemente distribuído ou maioritariamente no compartimento apical ou basolateral.

Quanto à possibilidade de agregação dos inibidores, sugere-se que no futuro se efetuem ensaios de forma a perceber se existe formação de dímeros ou mesmo agregados de maiores dimensões. A formação de agregados pode evitar o reconhecimento dos inibidores por parte do RAGE. Caso se prove a existência de agregação dos inibidores, seria interessante efetuarem-se testes para determinar se a agregação é ou não reversível na presença do recetor RAGE, ou seja se os inibidores têm maior afinidade para si próprios ou se para o recetor.

Futuramente, para a realização de ensaios *in vivo* em murganho transgénicos com a DA, sugere-se a utilização do inibidor C, uma vez que é o que reúne os melhores resultados do conjunto de ensaios realizados nesta tese.



## **6 Bibliografia**

---



1. Turner III, R. T., Koelsch, G., Hong, L., Castanheira, P., Ghosh, A., and Tang, J. (2001) Subsite Specificity of Memapsin 2 ( $\beta$ -Secretase ): Implications for Inhibitor Design, *American Chemical Society* 40, 10001–10006.
2. Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy, *Physiological Reviews* 81, 741–766.
3. Blagosklonny, M. V. (2009) Validation of anti-aging drugs by treating age-related diseases., *Aging* 1, 281–288.
4. Callaway, E. (2012) Gene mutation defends against Alzheimer ' s disease, *Nature* 487, 153.
5. Citron, M. (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification., *Nature reviews. Drug discovery*, Nature Publishing Group 9, 387–398.
6. Strooper, B., Vassar, R., and Golde, T. (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease., *Nature Reviews Neurology* 6, 99–107.
7. Sonkusare, S. K., Kaul, C. L., and Ramarao, P. (2005) Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope., *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 51, 1–17.
8. Vathipadiekal, V., Pandey, P. N., and Rao, M. (2005)  $\beta$ - secretase: A potential therapeutic target in Alzheimer's Disease, *Advanced Biotechnology* 12–16.
9. Probst, G., and Xu, Y. (2012) Small-molecule BACE1 inhibitors: a patent literature review (2006 - 2011)., *Expert opinion on therapeutic patents* 22, 511–540.
10. Lee, M. K., Slunt, Hi. H., Martin, L. J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S. E., Seeger, M., Koo, E., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues., *The Journal of neuroscience* 16, 7513–7525.
11. Strooper, B. D., and Annaert, W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein., *Journal of cell science* 113, 1857–1870.
12. Cruts, M., and Broeckhoven, C. V. (1998) Presenilin mutations in Alzheimer's disease., *Human mutation* 11, 183–190.
13. Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Schupf, N., Brickman, A. M., Cosentino, S., Tang, M. X., and Stern, Y. (2009) Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease., *JAMA : the journal of the American Medical Association* 302, 627–637.
14. Zheng, H., and Koo, E. H. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid., *Molecular neurodegeneration* 1, 1–12.
15. Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011) APP processing in Alzheimer's disease., *Molecular brain*, BioMed Central Ltd 4, 1–13.
16. Reinhard, C., Hébert, S. S., and De Strooper, B. (2005) The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function., *The EMBO journal* 24, 3996–4006.
17. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., Hyslop, P. S. G., and

- Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice., *Nature medicine* 3, 67–72.
18. Wolfe, M. S. (2008) -Secretase : Structure , Function , and Modulation for Alzheimer ' s Disease, *Current topics in medicinal chemistry* 8, 2–8.
  19. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein., *Nature* 391, 387–390.
  20. , Roßner, S., Beck, M., Stahl, T., Mendla, K., Schliebs, R., and Bigl, V. (2000) Constitutive overactivation of protein kinase C in guinea pig brain increases  $\alpha$ -secretory APP processing without decreasing  $\beta$ -amyloid generation., *The European journal of neuroscience* 12, 3191–200.
  21. Vassar, R., and Kandalepas, P. C. (2011) The  $\beta$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease., *Alzheimer's research & therapy* 3, 20.
  22. Park, H., and Lee, S. (2003) Determination of the active site protonation state of beta-secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design., *Journal of the American Chemical Society* 125, 16416–22.
  23. Mancini, F., De Simone, A., and Andrisano, V. (2011) Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors., *Analytical and bioanalytical chemistry* 400, 1979–1996.
  24. Li, R., Lindholm, K., Yang, L., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., and Shen, Y. (2004) Amyloid  $\beta$  peptide load is correlated with increased  $\beta$ -secretase activity in sporadic Alzheimer ' s disease patients, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 3632–3637.
  25. Fukumoto, H., Rosene, D. L., Moss, M. B., Raju, S., Hyman, B. T., and Irizarry, M. C. (2004) Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain., *The American journal of pathology* 164, 719–25.
  26. Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M., and Walsh, D. M. (2008) Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases., *Molecular medicine* 14, 451–464.
  27. Ohno, M., Sametsky, E. a, Younkin, L. H., Oakley, H., Younkin, S. G., Citron, M., Vassar, R., and Disterhoft, J. F. (2004) BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, *Neuron* 41, 27–33.
  28. Laird, F. M., Cai, H., Savonenko, A. V., Farah, M. H., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H., Xu, G., Vassilis, E., Borchelt, D. R., Price, D. L., Lee, H., and Philip, C. (2008) BACE1, a Major Determinant of Selective Vulnerability of the Brain to Amyloid- $\beta$  Amyloidogenesis, is Essential for Cognitive, Emotional, and Synaptic Functions, *Journal of neurosciences* 25, 11693–11709.
  29. Huang, Y., and Mucke, L. (2012) Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies., *Cell*, Elsevier Inc. 148, 1204–1222.
  30. Sinha, S., Anderson, J., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaar, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., and Varghese, J. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein  $\beta$ -secretase from human brain, *Nature* 402, 537–540.

31. Hong, L., Koelsh, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosht, A. K., Zhang, X. C., and Tang, J. (2000) Structure of the Protease Domain of Memapsin 2 (beta -Secretase) Complexed with Inhibitor, *Science* 290, 150–153.
32. Ermolieff, J., Loy, J., Koelsch, G., and Tang, J. (2000) Proteolytic activation of recombinant promemapsin 2 (Pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates, *Biochemistry* 39, 12450–12456.
33. Hanessian, S., Yun, H., Hou, Y., Yang, G., Bayrakdarian, M., Therrien, E., Moitessier, N., Roggo, S., Veenstra, S., Tintelnnot-Blomley, M., Rondeau, J.-M., Ostermeier, C., Strauss, A., Ramage, P., Paganetti, P., Neumann, U., and Betschart, C. (2005) Structure-based design, synthesis, and memapsin 2 (BACE) inhibitory activity of carbocyclic and heterocyclic peptidomimetics., *Journal of medicinal chemistry* 48, 5175–5190.
34. Yang, W., Lu, W., Lu, Y., Zhong, M., Sun, J., Thomas, A. E., Wilkinson, J. M., Fucini, R. V, Lam, M., Randal, M., Shi, X.-P., Jacobs, J. W., McDowell, R. S., Gordon, E. M., and Ballinger, M. D. (2006) Aminoethylenes: a tetrahedral intermediate isostere yielding potent inhibitors of the aspartyl protease BACE-1., *Journal of medicinal chemistry* 49, 839–842.
35. Hussain, I., Hawkins, J., Harrison, D., Hille, C., Wayne, G., Cutler, L., Buck, T., Walter, D., Demont, E., Howes, C., Naylor, A., Jeffrey, P., Gonzalez, M. I., Dingwall, C., Michel, A., Redshaw, S., and Davis, J. B. (2007) Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo., *Journal of neurochemistry* 100, 802–809.
36. Charrier, N., Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Hawkins, J., Howes, C., Hubbard, J., Hussain, I., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S., and Wayne, G. (2009) Second generation of BACE-1 inhibitors. Part 1: The need for improved pharmacokinetics., *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Elsevier Ltd 19, 3664–3668.
37. Koike, M., Nakanishi, H., Saftig, P., Ezaki, J., Isahara, K., Ohsawa, Y., Schulz-Schaeffer, W., Watanabe, T., Waguri, S., Kametaka, S., Shibata, M., Yamamoto, K., Kominami, E., Peters, C., von Figura, K., and Uchiyama, Y. (2000) Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 6898–6906.
38. Casas, S., Casini, P., Piquer, S., Altirriba, J., Soty, M., Cadavez, L., Gomis, R., and Novials, A. (2010) BACE2 plays a role in the insulin receptor trafficking in pancreatic  $\beta$ -cells., *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E1087–1095.
39. Ness, D., Buttini, M., Jordan, W., Liao, A., Zhao, J., Chen, M., Brigham, E., Wallace, W., Tonn, G., Goldbach, E., and Rudewicz, P. (2011) Neuropathology associated with administration of a nonselective beta secretase (BACE) and cathepsin D inhibitor in Mdr 1a/b knockout mice, *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 7, S705.
40. Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000) BACE2, a  $\beta$ -secretase homolog, cleaves at the  $\beta$  site and within the amyloid- $\beta$  region of the amyloid- $\beta$  precursor protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9712–9717.
41. Rajendran, L., Knölker, H.-J., and Simons, K. (2010) Subcellular targeting strategies for drug design and delivery., *Nature reviews. Drug discovery*, Nature Publishing Group 9, 29–42.
42. Lu, T.-S., Chen, H.-W., Huang, M.-H., Wang, S.-J., and Yang, R.-C. (2004) Heat shock treatment protects osmotic stress-induced dysfunction of the blood-brain barrier through preservation of tight junction proteins., *Cell stress & chaperones* 9, 369–77.

43. Mann, G. E., Yudilevich, D. L., and Sobrevia, L. (2003) Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells., *Physiological reviews* 83, 183–252.
44. Abbott, N. J., Rönnebeck, L., and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier., *Nature reviews. Neuroscience* 7, 41–53.
45. Abbott, N. J., Patabendige, A. a K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier., *Neurobiology of disease*, Elsevier Inc. 37, 13–25.
46. Abbott, N. J. (2005) Physiology of the blood–brain barrier and its consequences for drug transport to the brain, *International Congress Series 1277*, 3–18.
47. Chen, Y., and Liu, L. (2012) Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier., *Advanced drug delivery reviews*, Elsevier B.V. 64, 640–665.
48. Egleton, R. D., and Davis, T. P. (2005) Development of Neuropeptide Drugs that Cross the Blood-Brain Barrier, *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2, 44–53.
49. Cioni, C., Turlizzi, E., Zanelli, U., Oliveri, G., and Annunziata, P. (2012) Expression of Tight Junction and Drug Efflux Transporter Proteins in an in vitro Model of Human Blood-Brain Barrier., *Frontiers in psychiatry* 3, 1–8.
50. Gospodarska, E., Kupniewska-Kozak, A., Goch, G., and Dadlez, M. (2011) Binding studies of truncated variants of the A $\beta$  peptide to the V-domain of the RAGE receptor reveal A $\beta$  residues responsible for binding, *Biochimica et Biophysica Acta* 1814, 592–609.
51. Deane, R., Singh, I., Sagare, A. P., Bell, R. D., Ross, N. T., Larue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R. J., Thiyagarajan, M., Zarcone, T., Fritz, G., Friedman, A. E., Miller, B. L., and Zlokovic, B. V. (2012) A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid  $\beta$ -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease, *The journal of clinical investigation* 122, 1377–1392.
52. Deane, R., Du Yan, S., Submamaryan, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A. M., Armstrong, D. L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., and Zlokovic, B. (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain., *Nature medicine* 9, 907–13.
53. Deane, R., Wu, Z., and Zlokovic, B. V. (2004) RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier., *Stroke; American Heart Association* 35, 2628–2631.
54. Giri, R., Shen, Y., Stins, M., Yan, S. Du, Schmidt, A. M., Stern, D., Kim, K., Zlokovic, B., and Kalra, V. K. (2000)  $\beta$  -Amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1, *American Journal Physiology - cell physiology* 279, C1772–C1781.
55. Takuma, K., Fang, F., Zhang, W., Yan, S., Fukuzaki, E., Du, H., Sosunov, A., McKhann, G., Funatsu, Y., Nakamichi, N., Nagai, T., Mizoguchi, H., Ibi, D., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M., Yamada, K., and Yan, S. S. (2009) RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20021–20026.

56. Verdier, Y., Zarándi, M., and Penke, B. (2004) Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease., *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 10, 229–48.
57. Arancio, O., Zhang, H. P., Chen, X., Lin, C., Trinchese, F., Puzzo, D., Liu, S., Hegde, A., Yan, S. F., Stern, A., Luddy, J. S., Lue, L.-F., Walker, D. G., Roher, A., Buttini, M., Mucke, L., Li, W., Schmidt, A. M., Kindy, M., Hyslop, P. a, Stern, D. M., and Du Yan, S. S. (2004) RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice., *The EMBO journal* 23, 4096–105.
58. Gunaratna, C. (2000) Drug Metabolism & Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer for Bioanalytical Chemists , Part I, *Current Separations* 19, 17–23.
59. Jia, L., and Liu, X. (2009) The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments, *Curr Drug Metab.* 8, 822–829.
60. Mathew, S. J., Manji, H. K., and Charney, D. S. (2008) Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders., *Neuropsychopharmacology* 33, 2080–2092.
61. Alavijeh, M. S., Chishty, M., Qaiser, M. Z., and Palmer, A. M. (2005) Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery., *The journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2, 554–571.
62. Kim, K. S. (2008) Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier., *Nature reviews. Microbiology* 6, 625–634.
63. Kretzmer, G. (2002) Industrial processes with animal cells., *Applied microbiology and biotechnology* 59, 135–142.
64. Castilho, L. R., Moraes, Â. M., Augusto, E. F. P., and Butler, M. (2008) Animal Cell Techonology: From biopharmaceuticals to gene therapy, pp 1–517, Taylor & Francis Group, New York.
65. Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaler, G., and Lewis, D. (2002) Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1., *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 30, 407–414.
66. Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases., *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V. 1788, 842–857.
67. Petty, M. a, and Lo, E. H. (2002) Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation., *Progress in neurobiology* 68, 311–323.
68. Garcel, A., Martel, S., Carrupt, P. A., Doelker, E., and Delie, F. Article In vitro blood brain barrier models as a screening tool for colloidal drug delivery systems and other nanosystems 1, 133–163.
69. Nakagawa, S., Deli, M. a, Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2007) Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells., *Cellular and molecular neurobiology* 27, 687–694.
70. Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, a, Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J.-O., and Osterberg, T. (2005) In vitro models for the blood-brain barrier., *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 19, 299–334.

71. Weksler, B. B., Subileau, E. a, Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. a, and Couraud, P. O. (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line., *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1872–1874.
72. Weksler, B., Romero, I. a, and Couraud, P.-O. (2013) The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier., *Fluids and barriers of the CNS*, Fluids and Barriers of the CNS 10, 16.
73. Hughes, S. E. (1996) Functional Characterization of the Spontaneously Transformed Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line ECV304: Use in an in Vitro Model of Angiogenesis, *Experimental Cell Research* 225, 171–185.
74. Lundquist, S., Renftel, M., Brillault, J., Fenart, L., Cecchelli, R., and Dehouck, M.-P. (2002) Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models., *Pharmaceutical research* 19, 976–981.
75. Yoon, C. H., Kim, S. J., Shin, B. S., Lee, K. C., and Yoo, S. D. (2006) Rapid screening of blood-brain barrier penetration of drugs using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography., *Journal of biomolecular screening* 11, 13–20.
76. Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J., and Carter, G. T. (2003) High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier, *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 223–232.
77. Di, L. I., Kerns, E. H., Bezar, I. A. N. F., Petusky, S. L., and Huang, Y. (2009) Comparison of Blood – Brain Barrier Permeability Assays: In Situ Brain Perfusion , MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB 98, 1980–1991.
78. Langerholc, T., Maragkoudakis, P. a., Wollgast, J., Gradisnik, L., and Cencic, A. (2011) Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition, *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier Ltd 22, S11–S20.
79. Artursson, P., and Karlsson, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 880–885.
80. Natoli, M., Leoni, B. D., D’Agnano, I., D’Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., Zucco, F., and Felsani, A. (2011) Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer., *Journal of cellular physiology* 226, 1531–1543.
81. Shimizu, M. (2010) Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74, 232–241.
82. Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. (2001) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport., *Advanced drug delivery reviews* 46, 27–43.
83. Vachon, P. H., Perreault, N., Magny, P., and Beaulieu, J. F. (1996) Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes., *Journal of cellular physiology* 166, 198–207.
84. Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., and Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics., *Cell biology and toxicology* 21, 1–26.



85. Arriba, S. G., Loske, C., Meiners, I., Fleischer, G., Lobisch, M., Wessel, K., Tritschler, H., Schinzel, R., and Münch, G. (2003) Advanced glycation endproducts induce changes in glucose consumption, lactate production, and ATP levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells by a redox-sensitive mechanism., *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 23, 1307–1313.
86. Anderle, P., Niederer, E., Rubas, W., Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Wunderli-Allenspach, H., Merkle, H. P., and Langguth, P. (1998) P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels., *Journal of pharmaceutical sciences* 87, 757–762.
87. Pardridge, W. M. (2003) Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development., *Molecular interventions* 3, 90–105, 51.
88. Ghosh, A. K., Shin, D., Downs, D., Koelsch, G., Lin, X., Ermolieff, J., and Tang, J. (2000) Design of potent inhibitors for human brain Memapsin 2 ( $\beta$ -Secretase), *American Chemical Society* 122, 3522–3523.
89. Valeur, E., and Bradley, M. (2009) Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents., *Chemical Society reviews* 38, 606–631.
90. Kuzmic, P., Sideris, S., Cregar, L. M., Elrod, K. C., Rice, K. D., and Janc, J. W. (2000) High-throughput screening of enzyme inhibitors: automatic determination of tight-binding inhibition constants., *Analytical biochemistry* 281, 62–67.
91. Henley, J. P., and Sadana, A. (1986) Deactivation theory., *Biotechnology and Bioengineering* 28, 1277–1285.
92. Corporation, P. CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, *Technical Bulletin Promega*.
93. Walgren, R. a, Walle, U. K., and Walle, T. (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells., *Biochemical pharmacology* 55, 1721–1727.
94. Chan, W., and White, P. (2000) Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach, *Oxford University Press* (Hames, B. D., Ed.) The practi., pp 1–346, Oxford University Press.
95. Hong, L., Turner, R. T., Koelsch, G., Shin, D., Ghosh, A. K., and Tang, J. (2002) Crystal structure of memapsin 2 (beta-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3., *Biochemistry* 41, 10963–7.
96. Evin, G., and Kenche, V. B. (2007) BACE Inhibitors as Potential Therapeutics for Alzheimer's disease, *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2, 188–199.
97. Kuzmic, P., Hill, C., Kirtley, M. P., and Janc, J. W. (2003) Kinetic determination of tight-binding impurities in enzyme inhibitors, *Analytical Biochemistry* 319, 272–279.
98. Murphy, D. J. (2004) Determination of accurate KI values for tight-binding enzyme inhibitors: an in silico study of experimental error and assay design., *Analytical biochemistry* 327, 61–7.
99. Adessi, C., Frossard, M.-J., Boissard, C., Fraga, S., Bieler, S., Ruckle, T., Vilbois, F., Robinson, S. M., Mutter, M., Banks, W. a, and Soto, C. (2003) Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease., *The Journal of biological chemistry* 278, 13905–13911.

100. Zill, H., Gu, R., Erbersdobler, H. F., Fo, U. R., and Faist, V. (2001) RAGE Expression and AGE-Induced MAP Kinase Activation in Caco-2 Cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, 1108–1111.
101. Hudson, B. I., Carter, A. M., Harja, E., Kalea, A. Z., Arriero, M., Yang, H., Grant, P. J., and Schmidt, A. M. (2008) Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants., *The FASEB journal* 22, 1572–1580.
102. ABGENT. RAGE (AGER) Antibody (N-term) - Specification.
103. Shirasawa, M., Fujiwara, N., Hirabayashi, S., Ohno, H., and Iida, J. (2004) Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells, *Genes to Cells* 9, 165–174.
104. Bock, U., Kottke, T., Gindorf, C., and Haltner, E. (2003) Validation of the Caco-2 cell monolayer system for determining the permeability of drug substances according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS), *Biopharmaceutics Classification System ( BCS )* 1–7.
105. Prieto, P., Hoffmann, S., Tirelli, V., Tancredi, F., González, I., Bermejo, M., and De Angelis, I. (2010) An exploratory study of two Caco-2 cell models for oral absorption: a report on their within-laboratory and between-laboratory variability, and their predictive capacity., *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 38, 367–386.
106. Marasanapalle, V., Li, X., Polin, L., and Jasti, B. R. (2006) Novel in vitro model barriers for evaluation of the permeability of antitumor compounds, thioxanthenes., *Investigational new drugs* 24, 111–6.
107. Braun, A., Hämmerle, S., Suda, K., Rothen-Rutishauser, B., Günthert, M., Krämer, S. D., and Wunderli-Allenspach, H. (2000) Cell cultures as tools in biopharmacy., *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 11 Suppl 2, S51–60.
108. Yu, H., Cook, T. J., and Sinko, P. J. (1997) Evidence for Diminished Functional Expression of intestinal Transporters in Caco-2 Cell Monolayers at High Passages, *Pharmaceutical research* 14, 757 – 762.
109. Behrens, I., and Kissel, T. (2003) Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?, *European journal of pharmaceutical sciences* 19, 433–442.
110. Behrens, I., Kamm, W., Dantzig, A. H., and Kissel, T. (2004) Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin., *Journal of pharmaceutical sciences* 93, 1743–1754.